UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL FUERTE

SELECCIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS* spp. Y *TRICHODERMA* spp. Y SU APLICACIÓN CON COMPOSTAS PARA EL CONTROL DE LA RABIA EN GARBANZO BLANCO (*Cicer arietinum* L.)

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

JULIAN ALBERTO GALAVIZ LARA

CONSEJO REVISOR

Director de Tesis: Dr. Pedro Sánchez Peña

Codirector: Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez

Asesores: Dr. Saúl Parra Terraza

Dra. Blanca Elvira López Valenzuela

Culiacán, Sinaloa, México. Junio del 2020

La presente tesis titulada "**SELECCIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS* spp. Y *TRICHODERMA* spp. Y SU APLICACIÓN CON COMPOSTAS PARA EL CONTROL DE LA RABIA EN GARBANZO BLANCO (*Cicer arietinum* L.)**

Realizada por el alumno **JULIAN ALBERTO GALAVIZ LARA**, bajo la dirección del Comité de Tesis indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Comité de asesores:

Director (a): _____

Dr. Pedro Sánchez Peña

Director externo: _____

Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez

Asesor: _____

Dr. Saúl Parra Terraza

Asesor: _____

Dra. Blanca Elvira López Valenzuela

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe Julián Alberto Galaviz Lara, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 1709653-7, de la Unidad Académica Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Pedro Sánchez Peña y Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez cede los derechos del trabajo titulado "Selección de cepas de *Bacillus y Trichoderma* y su aplicación con compostas para el control de la rabia en garbanzo blanco(*Cicer arietinum* L.)", a la Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE

Julián A. Galaviz L.

Julián Alberto Galaviz Lara

DOMICILIO: Calle Nueve # 116, Fracc. Santa María. Guasave, Sinaloa, México.
TELÉFONO: 6871060747
CORREO ELECTRÓNICO: juliangl1486@hotmail.com
CURP: GALJ860814HSLLRL02

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme inculcado desde niño que tenía que estudiar y no quitar el dedo del renglón para que yo saliera adelante.

A mi esposa e hija por impulsarme a hacer un posgrado de calidad.

A mis hermanos que son buenos conmigo y que siempre estuvieron conmigo en todo.

A el Dr. Pedro Sánchez Peña por haber aceptado ser mi director de tesis y ayudarme en este proyecto, gracias por compartir sus conocimientos conmigo ayudándome en todo.

Al Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez le agradezco por siempre estar al pendiente de mí, por su conocimiento y experiencia transmitidas, por sus consejos y orientación para el trabajo de tesis, gracias por todo.

Al Dr. Saúl Parra Terraza por haber aceptado ser parte del comité de tesis y ayudarme en este proyecto.

A la Dra. Blanca Elvira López Valenzuela por haber aceptado ser parte del comité de tesis y ayudarme en este proyecto en todo momento a continuar con el trabajo de investigación.

Al CIIDIR IPN SINALOA por permitirme realizar los trabajos de investigación en laboratorio e invernadero.

A los amigos Héctor Morales y América Cota

A los alumnos Alomar y Guillermo por ayudarme en los trabajos de muestreo y establecimientos de los experimentos de invernadero y campo.

Al M.C. EFREN CABANILLAS por su disposición de ayudar con el trabajo con la donación de su composta lombrifer tecomate.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRATC	iv
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	3
2.1. Importancia de las compostas en el control biológico.	3
2.2. Antagonistas usados en el control biológico de patógenos de plantas.	3
2.3. Mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción.	5
2.3.1. Antibiosis.	5
2.3.2. Competencia.	5
2.3.3. Parasitismo.	6
2.3.4. Predación.	6
2.3.5. Inducción de resistencia a la enfermedad.	6
2.4. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento.	6
2.5. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.	7
2.6. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.	7
2.7. *Trichoderma* como controlador biológico.	8
2.8. *Bacillus* spp.	10
2.8.1. Morfología de *Bacillus*	10
2.8.2. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento.	11

2.8.3. Mecanismos de acción. 11

2.8.4. *Bacillus* como controlador biológico. 11

2.9. Nitrógeno en el suelo. 11

2.10. Fertilización. 12

2.11. Normas de calidad para garbanzo 13

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS. 14

3.1. Objetivo general. 14

3.2. Objetivo específico. 14

3.3. Hipótesis 14

IV. MATERIALES Y MÉTODOS. 15

4.1. Muestreo de suelo con raíces. 15

4.2. Aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. 15

4.3. Selección en invernadero de los aislados de *Bacillus* y *Trichoderma*. 16

4.3.1. Análisis de propágalos de hongos fitopatógenos en suelo. 17

4.4. Tratamientos y diseño experimental en invernadero. 17

4.5. Variables por evaluar. 17

4.5.1. Altura de planta. 17

4.5.2. Peso seco de follaje. 17

4.5.3. Análisis foliar. 18

4.5.3.1. Digestión húmeda para determinar: N, P, K, Ca y Mg. 18

4.5.3.1.1. Destilación de Nitrógeno total (NT) 19

4.5.3.1.2. Análisis de fósforo (P). 19

4.5.3.1.3. Análisis de potasio (K). 20

4.5.3.2. Determinación de calcio (Ca), magnesio (Mg), fierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu) y zinc (Zn). 20

4.6. Incidencia y severidad de la enfermedad “Rabia”. 20

4.7. Análisis estadístico. 21

4.8. Identificación morfológica de *Bacillus* y *Trichoderma*. 21

4.9. Identificación molecular de *Bacillus* y *Trichoderma*. 21

4.9.1. Análisis molecular. 22

4.9.2. Extracción de ADN de candidatos *Bacillus*. 22

4.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Bacillus.* 22

4.9.4. Extracción de ADN de candidatos *Trichoderma*. 23

4.9.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Trichoderma.* 23

4.9.6. Análisis de las secuencias de *Trichoderma*. 24

4.10. Preparación de las compostas. 24

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 25

5.1. Propágalos de hongos en el suelo. 25

5.2. Selección de cepas de *Bacillus* como antagonistas a los patógenos causantes de la rabia en garbanzo. 25

5.3. Volumen y peso seco de raíz en experimento en invernadero de selección de cepas de *Bacillus*. 26

5.4. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en el follaje de garbanzo en experimento de invernadero en la selección de cepas de *Bacillus*. 27

5.5. Incidencia y severidad en la selección de cepas de *Bacillus*. 28

5.6. Selección de cepas de *Trichoderma* como antagonistas a los patógenos causantes de la rabia del garbanzo. Variables de peso seco de follaje y altura de planta en experimento de invernadero para la selección. 30

5.7. Peso seco y volumen de raíz en experimento de invernadero en la selección de *Trichoderma*. 31

5.8. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en follaje de garbanzo en experimento de invernadero en selección de cepas de *Trichoderma*. 32

5.9. Incidencia y severidad en la selección de cepas de *Trichoderma*. 33

5.10. Compostas enriquecidas con *Bacillus* y *Trichoderma* en el control de patógenos causantes de la rabia del garbanzo. 35

5.10.1. Altura de planta y peso seco del follaje. 35

5.10.2. Peso seco de raíz y volumen de raíz en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de la rabia del garbanzo. 36

5.10.3. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo. 37

5.10.4. Incidencia y severidad en experimento de compostas enriquecidas con *Bacillus* y *Trichoderma* en el control de la enfermedad rabia en garbanzo. 38

5.11. Identificación morfológica de candidatos *Bacillus*. 40

5.12. Identificación molecular de candidatos de *Bacillus.* 41

5.12.1. Análisis de las secuencias de *Bacillus*. 41

5.13. Identificación de *Trichoderma* en microscopio confocal. 41

5.14. Identificación molecular de candidatos *Trichoderma*. 42

5.14.1. Análisis de las secuencias de *Trichoderma.* 42

VI. CONCLUSIONES. 43

VII. BIBLIOGRAFÍA. 44

ÍNDICE DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Localización GPS de los sitios muestreados. 15

Cuadro 2. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje y altura de planta en el experimento de selección de cepas de *Bacillus* en garbanzo. 26

Cuadro 3. Comparación de media de tratamientos en volumen y peso seco de raíz en el experimento de selección de cepas de *Bacillus* en garbanzo. 27

Cuadro 4. Comparación de media de tratamientos en porciento de nitrógeno (% de N), fósforo (% de P), potasio (% de K), calcio (% de Ca) y magnesio (% de Mg) en follaje en el experimento de selección de cepas de *Bacillus* en garbanzo. 28

Cuadro 5. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje y altura de planta en el experimento de selección de cepas de *Trichoderma* en garbanzo. 31

Cuadro 6. Comparación de media de tratamientos en volumen y peso seco de raíz en el experimento de selección de cepas de *Trichoderma* para el control de rabia en garbanzo. 32

Cuadro 7. Comparación de media de tratamientos en concentración de N, P, K, Ca y Mg) en el follaje de garbanzo en el experimento de selección de cepas de *Trichoderma*. 33

Cuadro 8. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje, altura de planta, en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo. 36

Cuadro 9. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje y altura de planta en experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma y Bacillus* para el control de rabia en garbanzo. 37

Cuadro 10. Comparación de media de tratamientos en concentración de N, P, K, Ca y Mg) en el follaje de garbanzo en el experimento de selección de compostas enriquecidas con *Bacillus* y *Trichoderma* para el control de rabia en garbanzo. 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Comparación de tratamientos de las cepas de *Bacillus* B4 y B11 contra el testigo. 30

Figura 2. Comparación de tratamientos de las cepas de *Trichoderma* C1 y C20 contra el testigo. 35

Figura 3. Comparación de las compostas enriquecidas con *Bacillus* B4 y *Trichoderma* C1 contra el testigo. 40

En México el estado de Sinaloa es el principal productor de garbanzo blanco. En los últimos diez años se han sembrado un promedio de 30,897, ha[1] tanto en riego como en temporal, cosechándose un total de 53,658 t (SAGARPA, 2016). El garbanzo *(Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa de grano seco que se cultiva alrededor del mundo, sólo después del frijol *(Phaseolus vulgaris* L.) (Hervas *et al,* 1998). Una de las principales limitantes de su producción en este estado y otras regiones del mundo, es la enfermedad conocida como "marchitez" o "rabia" del garbanzo, la cual es ocasionada por el complejo de hongos fitopatogenos: *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Esta enfermedad causa pérdidas severas en el cultivo que oscilan del 10–50% de la producción (García–Estrada *et al.,* 2004). Una alternativa para el control de la enfermedad es el control biológico utilizando microorganismos antagonistas como bacterias y hongos, como *Bacillus y Trichoderma*, además la aplicación de compostas mejora la estructura del suelo, así como la retención de la humedad facilita la absorción de los nutrientes por parte de la planta y mejora la sanidad de éstas Tisdale y Nelson, 1996; Tan y Napamombodi, 1979; Guerrero, 1996; Bellapar 1996 y Bollo, 1999). Por lo que se pretende en este trabajo, seleccionar cepas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., nativos de la región para enriquecer compostas en el control de la enfermedad “rabia” en garbanzo blanco. Para ello se aislaron cepas nativas de *Bacillus* y *Trichoderma* a partir de la Rhizosfera de diferentes plantas de la región incluyendo plantas de garbanzo, los aislados fueron seleccionados en invernadero para obtener las mejores cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* en el control de rabia en garbanzo, las mejores cepas seleccionadas se combinaron con composta se utilizaron dos tipos lombricomposta y tipo Bocashi, en los resultados obtenidos, la cepa de *Bacillus* B4, presentó mejor efecto protector la cual se identificó molecularmente correspondiendo a *Bacillus pumilus* con un alinieamiento del 100%, en *Trichoderma* la cepa C1 como mejor cepa se ubicó como especie *harzianum*. El garbanzo mostro un mejor crecimiento con la aplicación de compostas, además dieron un mayor efecto protector de las cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* cuando se combinaban con compostas al reducir la severidad de la enfermedad en garbanzo. La composta que presentó mejor efecto protector fue la de tipo Bocashi.

In Mexico, the state of Sinaloa is the main producer of white chickpea. In the last ten years, an average of 30,897 have been planted, ha1 both in irrigation and in season, harvesting a total of 53,658 t. (SAGARPA, 2016). Chickpea (Cicer arietinum L.) is the second dry grain legume grown around the world, only after beans (Phaseolus vulgaris L.) (Hervas *et al*, 1998). One of the main limitations of its production in this state and other regions of the world, is the disease known as "wilt" or "rabies" of chickpea, which is caused by the complex of phytopathogenic fungi: *Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr*. , *Rhizoctonia solani Kühn* and *Sclerotium rolfsii Sacc*. This disease causes severe losses in the crop that range from 10–50% of production (García – Estrada *et al*., 2004). An alternative for the control of the disease is biological control using antagonistic microorganisms such as bacteria and fungi, such as *Bacillus* and *Trichoderma*, in addition the application of compost improves the structure of the soil, as well as the retention of humidity, it facilitates the absorption of nutrients by the plant and improves its health. Tisdale and Nelson, 1996; Tan and Napamombodi, 1979 ,; Guerrero, 1996 ;, Bellapar 1996 and Bollo, 1999). For what is intended in this work, select strains of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp., natives of the region to enrich compost in the control of the disease "rabies" in white chickpea. For this, native strains of *Bacillus* and *Trichoderma* were isolated from the Rhizosphere of different plants in the region including chickpea plants, the isolates were selected in the greenhouse to obtain the best strains of *Bacillus* and *Trichoderma* in controlling rabies in chickpea, The best selected strains were combined with compost, two types of vermicompost and Bocashi type were used. In the obtained results, the *Bacillus* B4 strain presented a better protective effect, which was identified molecularly, corresponding to *Bacillus pumilus* with 100% alignment, in *Trichoderma* the C1 strain as the best strain was located as a *harzianum* species. The chickpea showed a better growth with the application of compost, they also gave a greater protective effect of the *Bacillus* and *Trichoderma* strains when combined with compost by reducing the severity of the disease in chickpea. The compost that presented the best protective effect was the Bocashi type.

I. INTRODUCCIÓN

En México el estado de Sinaloa es el principal productor de garbanzo blanco. En los últimos diez años se han sembrado un promedio de 30,897 t. tanto en riego como en temporal, cosechándose un total de 85 mil 487 t. (SAGARPHA, 2018), a nivel mundial nuestro país es el sexto productor de esta leguminosa, con una producción de 183 mil 576 t en el ciclo 2017-2018 (SAGARPA, 2018).

El cultivo de garbanzo blanco tiene como propósito principal la producción de grano para consumo humano, a diferencia del garbanzo café, porquero o forrajero, que es destinado para la alimentación pecuaria. La producción de garbanzo blanco es destinada principalmente para exportación, se considera una fuente importante de divisas para el país.

El garbanzo *(Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa de grano seco que se cultiva alrededor del mundo, sólo después del frijol *(Phaseolus vulgaris* L.) (Hervas *et al,* 1998). En México, el estado de Sinaloa es el mayor productor de este grano para consumo nacional y para exportación (Gómez *et al.,* 2003). Una de las principales limitantes de su producción en este estado y otras regiones del mundo, es la enfermedad conocida como "marchitez" o "rabia" del garbanzo, la cual es ocasionada por el complejo de hongos: *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Esta enfermedad causa pérdidas severas en el cultivo que oscilan del 10–50% de la producción (García–Estrada *et al.,* 2004). Algunas de las estrategias que han sido implementadas para su control son la rotación de cultivos, el retiro de socas y el uso de semilla libre de patógenos y/o tratadas con fungicidas; sin embargo, los resultados han sido poco satisfactorios. El desarrollo de plantas con resistencia genética ofrece la mejor estrategia práctica y económica para el manejo de la enfermedad (Hervas *et al.,* 1998); sin embargo, la presencia de nuevas razas de patógenos limita esta última estrategia (Jiménez–Díaz *et al.,* 1993).

Otra alternativa para el control de la enfermedad es el control biológico utilizando microorganismos antagonistas como bacterias y hongos. Diversas investigaciones han demostrado que el control biológico a través del uso de hongos y bacterias benéficas es una alternativa potencial al uso de fungicidas y/o fumigantes. Por ejemplo, Kaur y Muthamilan (1992) demostraron que, en experimentos en campo, el complejo de hongos causantes de la marchitez del garbanzo, incluyendo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr.f. sp. *ciceris* que controlado efectivamente por *Trichoderma harzianum* Rifai. En otro estudio en semilla de garbanzo, la aplicación de la cepa RBT13 de *Pseudomonas fluorescens* Migula disminuyó en 52% la marchitez por *Fusarium* y adicionalmente incrementó la germinación, el crecimiento y el rendimiento del cultivo (Kumar y Dube, 1992).

Diversas especies de *Bacillus,* aisladas de la rizósfera de garbanzo han demostrado capacidad para inhibir la germinación y el crecimiento de hifas de *F. oxysporum* f. sp. *Ciceris* y suprimir el desarrollo de la marchitez del garbanzo (Landa *et al.,* 1997). Además, se ha demostrado la supresión de hongos fitopatogenos del suelo por compostas (Hadar y Mandelbaum *et al*, 1992). Además, se ha comprobado la supresión de *pythium spp.* y *Rhizoctonia solani*, utilizando compostas preparadas con desechos orgánicos como por ejemplo la corteza de madera madura, estiércol de res y lodos activados (Chen *et al,* 1987). Por lo que en este trabajo se pretende seleccionar cepas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., nativos de la región para enriquecer compostas en el control de la enfermedad “rabia” en garbanzo blanco.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Importancia de las compostas en el control biológico

La agricultura tecnificada que se practica en gran parte del mundo paradójicamente conlleva a dos escenarios: por un lado contribuye a incrementar el rendimiento y calidad de cosechas y por otra parte genera una disminución de la productividad del suelo y participa en el deterioro del medio ambiente. Aunado a esto, el uso intensivo de productos agroquímicos contribuye a incrementar los costos de producción de los cultivos, impactando adversamente y de manera significativa, la sustentabilidad de la agricultura (Osorio, 2008).

La aplicación de las compostas mejora la estructura del suelo, así como la retención de la humedad además facilita la absorción de los nutrientes por parte de la planta (Tisdale y Nelson, 1996; Tan y Napamombodi, 1979; Guerrero, 1996; Bellapar, 1996 ; Bollo, 1999).

Los ácidos húmicos y fúlvicos de las compostas mejoran las propiedades físicas químicas y biológicas en los suelos, en consecuencia, ocurre un incremento en la fertilidad y productividad (Tisdae y Nelson, 1996; Tan y Napamombodi, 1979; Guerrero, 1996; Bellapar, 1996)

Se ha demostrado la supresión de hongos fitopatogenos del suelo en compostas (Hadar y mandelbaum *et al*, 1992). Además, se ha comprobado la supresión de *pythium spp.* Y *Rhizoctonia solani*, utilizando compostas preparadas con desechos orgánicos como por ejemplo la corteza de madera madura, estiércol de res y lodos activados (Chen *et al*, 1987).

Uno de los beneficios de las compostas es su potencial para controlar poblaciones de patógenos del suelo (Hadar y mandelbaum, 1992; oitink *et at*, 1991).

2.2. Antagonistas usados en el control biológico de patógenos de plantas

En la selección de antagonistas para el control de la rabia del garbanzo se ha enfatizado el uso de agentes individuales; sin embargo, parece factible que incrementando el número de agentes de biocontrol con el uso combinado de diferentes especies puede resultar en tratamientos de alta persistencia en la rizósfera, con mecanismos de control diferentes y con mayor resistencia a las

condiciones ambientales. Akkopru y Demir (2005) demostraron no sólo que la combinación de rizobacterias y *Glomus intraradices* Schenck y Smith es efectiva para controlar la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.), sino que también incrementa la colonización, el peso seco y el contenido de fósforo en la planta. Barea *et al.* (1998) reportaron que cepas de *Pseudomonas* productoras del antibiótico 2–4 diacetilfloroglucinol incrementan la germinación y biomasa de *Glomus mosseae* T.H. Nicolson Gerd) y Trappe,1998) así como su colonización en raíces de tomate *(Lycopersicon esculentum* Mill.). La mezcla de hongos antagonistas como *T. harzianum* y micorrizas arbúsculo–vesiculares (MAV) del hongo *Glomus intraradices* han demostrado que solos o en mezcla han sido efectivos en el control biológico de fitopatógenos de la raíz en hortalizas (Datnoff *et al.,* 1995). Estas investigaciones sugieren que las micorrizas y otros agentes de biocontrol pueden ser compatibles y usarse en combinación, lo cual induce mayor control que los agentes utilizados en forma individual (Linderman, 1988).

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos contra otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes que se utilizan para el control biológico se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas, Bacillus* y hongos de los géneros *Gliocadium*, Fusarium y *Trichoderma.* Este último es el más utilizado para el control de un grupo de importantes patógenos del suelo. En la naturaleza existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolló la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Larrea, 2001), así mismo, las micorrizas ocasionan un incremento en la actividad de la rizósfera en favor de otros microorganismos que compiten con los fitopatógenos del suelo (Meyer y Linderman, 1986).

Ante esta situación, el enfoque de la nueva agricultura se contempla dentro de un marco de sustentabilidad, que involucra la búsqueda de estrategias que disminuyan el empleo de agroquímicos y que contribuyan a conservar el

medio ambiente. Una alternativa es la rama de la biotecnología llamada control biológico o biocontrol, el cual, de acuerdo con Cook y Baker (1983), se define como “la reducción de la cantidad de inóculo o de la actividad de un patógeno para producir una enfermedad por o a través de uno o más organismos distintos al hombre”.

El control biológico o biocontrol, en la actualidad, se basa en el empleo de microorganismos antagonistas, denominados agentes de control biológico, principalmente bacterias y hongos, contra patógenos que atacan a diferentes cultivos (López, 2011).

2.3. Mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. En general los antagonistas no tienen un solo modo de acción y la multiplicidad de modos de acción no es una característica a seleccionar en un antagonista. Se han descrito varios mecanismos de los antagonistas para controlar el desarrollo de fitopatogenos. Estos son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacción directa con el patógeno micoparasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook and Baker, 1983).

2.3.1. Antibiosis

Se refiere a la producción de sustancias toxicas por parte de un microorganismo contra otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones menores a 10 ppm. La antibiosis es el mecanismo de antagonismo más estudiado entre microorganismos (*Larrea 2001).*

2.3.2. Competencia

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya escasez de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxigeno o espacio. Existen dos tipos de interacciones directas

entre los antagonistas y los patógenos ellas son el parasitismo y la predación, (Larrea, 2001).

2.3.3. Parasitismo

El termino parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo entre o penetre a otro. Puede ser definido como una interacción antagónica entre organismos. El parasitismo consiste entre la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, b-1-3glucanasas y proteasa que lisan o digieren las paredes de los hongos (Melgarejo,1989 Ulhoa, 1996).

2.3.4. Predación

En el caso de la predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas (cuerpos) de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento (Camphell, 198)

2.3.5. Inducción de resistencia a la enfermedad

Las plantas presentan mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia endógena regulados genéticamente. Se puede inducir resistencia en plantas mediante el uso de diferentes inductores como quitosano (producto de la acetilación de la quitina). Y también mediante el uso de microorganismos antagonistas (Larrea, 2001)

2.4. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento

Para su establecimiento los hongos del género *Trichoderma* requieren de humedad entre 87% y 97%, un pH acido para su buen desarrollo en el suelo, y una fuente de alimentos (materia orgánica con actividad microbiológica alta) (Cook, 1989). En las distintas especies del género *Trichoderma* tiene un buen crecimiento frente a un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, su óptimo, se sitúa de 15°C a los 28°C. La temperatura máxima se encuentra entre los 30°C y 36°C y en el pH optimo entre 3.7 y 4.7 a concentraciones normales de

dióxido de carbono. Un potencial osmótico de -40 bares en el medio es tolerado por el hongo (Domsch *et at 1*990).

2.5. Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

Los microorganismos que permiten promover el crecimiento de las plantas, pueden sustituir o al menos reducir el uso de fertilizantes. Los principales efectos de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se han asociado con efectos favorables en la emergencia, en el desarrollo de la raíz y en la acumulación de biomasa con el subsecuente incremento en rendimiento. Los principales mecanismos de acción por los cuales las bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) pueden lograr estos efectos son los siguientes: aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Döbereiner *et al.,* 1995) producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal tales como auxinas, giberelinas y citocininas (Arshad y Frankenberger, 1998); producción de sideróforos (Zdor y Anderson, 1992; Cornish y Page, 2000); solubilizacion de minerales y nutrimentos (Crowley *et al.,* 1991); incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999); inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer *et al.,* 1991); inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede *et al.,* 1999); interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.,* 1996). Las bacterias PGPR pueden tener uno o varios mecanismos de los antes mencionados (Loredo *et al.,* 2004).

2.6. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Los mecanismos de acción que utiliza *Trichoderma* en la planta son: competencia, producción de antibióticos y microorganismos. Aunque no todos estos pasos ocurren en una interacción en particular en todos los organismos involucrados, la clave es la trasferencia de los nutrientes desde el microorganismo objetivo al micoparasito (Infante *et al*., 2009).

Según Cook y Barker (1983) la forma de acción de *T harzianum* es por la competencia y predación, enrollando su micelio en las hifas del patógeno blanco evitando el paso de los nutrientes y deteniendo su desarrollo. Se ha visto además que hifas susceptibles de los microorganismos blanco, siendo

vocuoladas, colapsando y siendo finalmente desintegradas. Por lo tanto el daño causado por *Trichoderma* al microorganismo blanco que es colonizado es severo; altera y degrada la pared celular, desorganiza el citoplasma, retrae la membrana plasmática de la pared, afecta a demás la replicación celular inhibiendo la germinación de esporas y la *Trichoderma* capaces de producir antibióticos especialmente a pH bajo (Cook, 1989). Este se puede encontrar dentro de la rizosfera y también fuera de ella, también coloniza y protege las raíces de la planta.

2.7. *Trichoderma* como controlador biológico

El hongo comenzó a ser utilizado en 1960 como degradador de celulosas y desde ese momento se ha utilizado en industrias química, textil, alimenticia y la de control biológico. Las razones para utilizar hongos de este género se deben al alto grado de adaptabilidad demostradas por su distribución cosmopolita, en casi todos los suelos del mundo, bajo diferentes condiciones ambientales por su carácter de saprofito (capaz de degradar materia orgánica en descomposición), este genera capacidad competidora con los demás microorganismos en las raíces de las plantas,

Trichoderma es considerado como uno de los principales hongos antagonistas, diversas investigaciones en biocontrol de *F. oxysporum* señalan que este microorganismo es un hongo antagónico muy eficiente en diversos cultivos incluyendo al garbanzo (Paredes *et al*., 2009; Avendaño y Arbeláez, 2006; Herrera, 2005; Kaur y Muthamilan, 1992). Al respecto, Howell y Samuel (2006) señalan que este hongo es un buen agente biocontrol, ya que reúne una serie de características en su interacción directa con fitopatógenos tal como su capacidad micoparasítica debido a enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, glucanasas y proteasas que lisan o digieren las pared celular de los fitopatógenos. Otra característica es su alta competencia por nutrientes, oxígeno y espacio (Benítez *et al*. 2004). Además, se ha observado que *Trichoderma* ejerce un efecto favorable en el desarrollo de las plantas, considerándose como un microorganismo promotor del crecimiento, ayudando en el desarrollo del tejido de las plantas mediante el aporte de fitohormonas y por medio de la

solubilización del fósforo y suministro de otros nutrientes (Akkopru y Demir, 2005; Mayak, 2004).

Todo lo anterior, unido al nivel más bajo del riesgo que presenta para los mamíferos y el ecosistema. Lo hacen unos de los mejores controladores que existen en el mundo. Muchos investigadores destacan sus propiedades como controladores biológicos, de múltiples formulados comerciales de distintas cepas para el control biológico de enfermedades (Gonzales *et al*., 2005).

Trichoderma es un género de hongos considerados cosmopolitas por que se encuentran en casi todos los suelos de las zonas climáticas del mundo y son importantes descomponedores de materiales leñosos y herbáceos. *Trichoderma* es un hongo invasor oportunista, que se caracteriza por su rápido crecimiento, por la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos y por la producción de una variedad de compuestos antimicrobianos. *Trichoderma* está entre los hongos saprofitos más comunes. Algunas cepas han sido explotadas como agentes de control biológico (BCA) de patógenos, incluyendo hongos y nematodos, todo mediado por la producción de enzimas de degradación de la pared celular, como: celulasas, quitinasas, glucanasas, entre otras, y la producción de antibióticos. También, han sido usadas en biorremediación, por su capacidad de degradar hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y los plaguicidas xenobióticos, utilizados en la agricultura (Verma *et al*.2007; Hoyos *et al*. 2009). *Trichoderma* se considera estimulador del crecimiento vegetal (Leandro *et al* 2007) e inductor de resistencia sistémica, debido a que modula o estimula algunas respuestas en la planta (Howell & Puckhaber, 2005; Howell, 2006).

Entre los efectos positivos de la inoculación de plantas con *Trichoderma* Harman *et al*. (2004) incluyen que el control biológico de enfermedades causadas por patógenos en la raíz y en algunos foliares. Inducción de resistencia sistémica en las plantas. Mejora la absorción de nutrientes, incluyendo, pero no limitado, al nitrógeno, además se mejora la solubilidad de los nutrientes del suelo, mayor desarrollo de las raíces y aumento de la formación de pelos radiculares (Harman *et al*. 2004; Harman, 2006)

2.8. *Bacillus* spp.

Gonzales y Fragozo señala que la bacteria *Bacillus* no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades anti fungicidas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Se utiliza de forma industrial como insecticidas y fungicidas. La subtilina liberada por B. *subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos (Gonzales *et al*. 2002).

El género *Bacillus* son bacterias Gram positiva, aerobio facultativo comúnmente encontrada en el suelo. Tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas, sus esporas pueden sobrevivir al calor extremo, su importancia en la agricultura se debe a que promueve el crecimiento y rendimientos de las plantas, mediante el fomento de la absorción de nutrimentos minerales, síntesis de fitohormonas y la supresión de enfermedades (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Guillén-Cruz *et al*., 2006; Pinton *et al*., 2001), por medio de antibiosis y la estimulación de mecanismos de defensa del hospedante (Stein, 2005).

2.8.1. Morfología de *Bacillus*

Según Gonzales y fragoso en 2002 *Bacillus subtilis*:

- Corresponde a una bacteria Gram positiva.
- Producen endoesporas, las que son termo resistente y también resisten factores físicos perjudiciales como la desecación, los ácidos y los desinfectantes químicos.
- Muchos bacilos producen enzimas hidrofilicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y donadores de electrones.
- Producen antibióticos y son ejemplo de estos bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y gramicidina y circulina.
- Son fermentativas, usualmente fermentan caseína y almidón.

2.8.2. Requerimientos nutricionales y condiciones óptimas de crecimiento

Bacillus el género más abundante en los suelos vírgenes. Los *Bacillus* en general crecen bien en medios sintéticos que contienen azucares, ácidos organicos, alcoholes, etc., como las únicas fuentes de carbono y el amonio como una fuente de nitrógeno. Viven dentro los límites de temperatura de 55°C a 70°C El límite inferior de pH para el género *Bacillus* es de 2 a 3 (Gonzales *et al,* 2002)

2.8.3. Mecanismos de acción

Sumando al antagonismo, la competencia y la liberación del contenido celular, *Bacillus* también ha demostrado inducir la resistencia sistémica natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungosos, propiedades llamada resistencia sistémica adquirida (Butt *et al*.,1999).

2.8.4. *Bacillus* como controlador biológico

Bacillus es conocido por ser antagonista de muchos hongos patógenos vegetales. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes; exclusión de sitios, colonización de la bacteria en el patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento. (Butt *et al*.,1999).

El tratamiento de semillas como los cereales, maíz dulce y zanahoria con suspensiones acuosa, pastas o polvos que contienen a las bacterias *B. subtilis*; han protegido a las plantas contra los patógenos de la raíz y ha dado resultado un mejor crecimiento y producción de esos cultivos (Agrios, 1997).

2.9. Nitrógeno en el suelo.

El suelo raramente contiene suficiente nitrógeno para el máximo crecimiento de las plantas, por lo tanto es el elemento que se aplica más extensivamente como fertilizante. La concentración de nitrógeno en las rocas ígneas es tan bajo que es despreciable para las necesidades de la planta (Thompson y Troeh, 1978).

Según Buckman y Brady (1970) las aportaciones de nitrógeno al suelo se dan principalmente por cuatro mecanismos:

a) Fijación de nitrógeno en forma simbiótica
b) Fijación de nitrógeno en forma no simbiótica
c) Aporte por precipitaciones
d) Aplicación como fertilizante.

La mayor cantidad de nitrógeno atmosférico fijado, se lleva a cabo por bacterias del género *Rhizobium*, que viven en simbiosis en las raíces de las plantas leguminosas, son capaces de formar nódulos con ellas donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno atmosférico por la actividad de la enzima nitrogenasa (López, 1982).

El garbanzo no forma nódulos con los *Rhizobium* clasificados en especies, sin embargo, es común en boletines técnicos del INIFAP ubicarlo en el grupo del chícharo como *Rhizobium leguminosarum*. Hasta ahora las líneas de *Rhizobium* de garbanzo no han sido elevadas a la categoría de especie, aunque el nombre inválido de *Rhizobium cicerie* se mencionó en una publicación de 1948 (Van Der Maesen, 1972).

2.10. Fertilización

Las variedades de garbanzo en riesgo expresan su mejor capacidad para producir grano y calidad cuando el suelo en el que se establece el cultivo es fértil y dispone de humedad suficiente. Se sugiere aplicar 80 kg de nitrógeno por hectárea (97 kg ha^{-1} de urea) si la siembra anterior fue sorgo, cártamo o cualquier cultivo que disminuya en forma considerable las reservas de nitrógeno del suelo (INIFAP)

En cuanto al fósforo, este se requiere en suelos con altas concentraciones de carbonato de calcio o muy delgados. En suelos profundos de barrial, se aplica fósforo solo si se ha observado respuesta a este elemento mediante un análisis de suelo, en dosis de 40 kilogramos de fósforo por ha (87 kg ha^{-1} de superfosfato de calcio T.

En terrenos de barrial planos, el fertilizante nitrogenado y fósforo debe aplicarse de preferencia en presiembra en forma (INIFAP)

En siembras de temporal no se sugiere abono a menos que si tenga humedad suficiente para que el producto se disuelva y actué adecuadamente,

sin dañar a la planta, este se puede aplicar durante la temporada de lluvia, antes de su rastreo, labor que también extermina la maleza. (INIFAP)

2.11. Normas de calidad para garbanzo.

Las normas de calidad que se manejan a nivel internacional y que la Unión Nacional de Productores y Exportadores de Garbanzo (UNPEG) ha establecido para la recepción de la cosecha, se divide en tres rangos; el primero de 0% al 1.5% de manchado; el segundo del 1.6% al 4% de manchado; y el tercero, de 4.1% al 8% de manchado. Asimismo los rangos de calibres se encuentran desde 44/46 hasta 60/63 semillas en 30 gramos.

La recepción es válida para garbanzo de cosecha vigente y con un máximo de 1.5 granos verdes y cafés, libres de plaga viva o muerta; exentos de granos picados por gorgojo y con un máximo de 2.5% de granos comidos por gusano.

Las tolerancias usuales del garbanzo en el mercado internacional generalmente son de 5% de daños totales, incluyendo: 0.5 de materias extrañas e impurezas, 1.5% de granos quebrados, 1.0% de granos mordidos por gusanos, 2.0% de granos con otros defectos, libre de gorgojo vivo o muerto y de granos mordidos por gorgojo. (UNPEG)

Como mencionamos el valor del producto cosechado por los agricultores lo fija la UNPEG, con base al precio internacional y, además, está en relación al tamaño, variedad, porciento de impurezas, así como de granos dañados. Estas características se presentan en función de la constitución genética de la variedad, manejo agronómico y condiciones del medio durante su cultivo y cosecha. Por lo anterior este trabajo tiene como objetivo principal seleccionar cepas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., nativos de la región para enriquecer compostas en el control de la enfermedad “rabia” en garbanzo blanco.

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general.

Seleccionar cepas de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., nativos de la región para enriquecer compostas en el control de la enfermedad “rabia” en garbanzo blanco.

3.2. Objetivos Específicos:

1. Aislar y seleccionar cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* nativas como antagonistas a los patógenos causantes de la rabia del garbanzo.
2. Identificar morfológicamente y molecularmente las cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* seleccionadas en garbanzo.
3 Comparar composta de bocashi contra lombricomposta en el control de rabia en garbanzo.
4 Evaluar composta enriquecida con las mejores cepas de *Bacillus y Trichoderma* para el biocontrol de la rabia en garbanzo.

3.3. Hipótesis

La composta enriquecida con *Bacillus y Trichoderma* controlan la enfermedad conocida como rabia (*fusarium*, *macrophomina* y *Rhizoctonia)* en garbanzo blanco (*Cicer arietinum* L.)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestreo de suelo con raíces.

Se obtuvieron un total de 26 muestras de suelos y raíces de plantas de cultivos de leguminosas, principalmente garbanzo, en los Valles de Angostura, Guasave y Ahome. En el mes de Marzo del año 2017 mediante la técnica reportada por Papavisas y Davey (1959).

Las muestras con suelos y raíces se llevaron al laboratorio para obtener suelo de la rhizosfera de cada planta, de este suelo se obtuvieron los aislados utilizando la técnica reportada por Papavisas y Davey (1959). Los datos geográficos de los sitios de colecta se obtuvieron mediante GPS mostrados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Localización GPS de los sitios muestreados.

LOCALIDAD	COORDENADAS
El Zopilote	25° 44' 44.7" N 108° 20' 58.9" W
Portugués de Gálvez	25° 43' 23.9" N 108° 23' 42.4" W
El Baral	25° 38' 34.5" N 108° 25' 39.1" W
León Fonseca	25° 43' 20.9" N 108° 21' 0.50" W
El Zopilote	25° 44' 53.8" N 108° 20' 45.3" W
Cofradía	25° 27' 37.9" N 108° 26' 13.2" W
San Antonio	25° 32' 39.6" N 108° 31' 0.43" W

4.2. Aislados de *Bacillus* spp y *Trichoderma* spp.

Para aislar *Bacillus*, un gramo de la rhizosfera se diluyó en solución salina estéril (NaCl 0.85%); se agitó y se pasteurizó a 80 ºC en baño maría por 15 minutos, se sembró 1 mililitro de inóculo en 9 mililitros de infusión de papa dextrosa (IPD) estéril. Se incubó a 37º C por 24 horas se pasteurizó de nuevo a 80ºC por 20 minutos y se sembró en placas con medio de cultivo agar nutritivo (AN). Las colonias que presentaron las características morfológicas de *Bacillus* (colonia

irregular plana, color crema sin brillo), se resembraron en cajas con AN por estría y se incubaron. Los aislados se preservaron en tubos con AN inclinado.

Los aislados de *Trichoderma* spp. Se obtuvieron mediante la técnica reportada por Papavisas y Davey (1959).

4.3. Selección en invernadero de las cepas de *Bacillus* y *Trichoderma*.

Se establecieron dos experimentos de invernadero, uno para seleccionar cepas de *Bacillus* y otro para seleccionar cepas de *Trichoderma*. Se incluyeron 2 cepas de cada una de *Bacillus* y *Trichoderma* de colección del laboratorio de nutrición vegetal.

En el experimento de selección se llenaron macetas con tierra de suelo contaminado con rabia y se evaluaron cepas de *Bacillus* en los tratamientos fueron las diferentes cepas aisladas, y un tratamiento con medio de cultivo (infusión de papa) y sin la cepa de *Bacillus*, cada tratamiento con cuatro repeticiones, en un diseño experimental completamente al azar, la unidad experimental fue una maceta con un volumen de 3 L la cual se llenó con suelo con problema de rabia. En el medio de cultivo de infusión papa dextrosa (IPD), se hicieron crecer los aislados de *Bacillus* para ser inoculadas en la plántula de garbanzo. Después de una semana de sembrado, se inoculo la cepa con los diferentes aislados de *Bacillus* según el tratamiento aplicando 1 ml de inoculo en cada planta en el invernadero. Las variables de respuesta a evaluar fueron; Volumen de raíces, altura de planta, grosor de tallo y peso seco de la planta incidencia y severidad de la enfermedad “rabia” en garbanzo.

En el experimento de selección de *Trichoderma*, al igual que el experimento para seleccionar *Bacillus*, el número de tratamiento consistió en evaluar las diferentes cepas aisladas, tratamiento sin inoculo y sin cepa de *Bacillus*. En un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Se evaluaron las mismas variables de respuestas en el anterior experimento. En la selección de composta se aplicaron el equivalente a 4 t ha^{-1}. Se utilizó el mismo diseño experimental con cuatro repeticiones y se evaluaron las mismas variables de respuesta.

4.3.1. Análisis de propágalos de hongos fitopatógenos en suelo.

El suelo utilizado para evaluar los experimentos fue analizado para determinar el número de propágalos por gramo de suelo en el laboratorio de fitopatología fito-labor en Juan José Ríos por el fitopatologo Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez mediante la técnica de Barnett y Hunter (1998).

4.4. Tratamientos y diseño experimental en invernadero.

En ambos experimentos de selección (experimento *Bacillus* y experimento *Trichoderma*) los tratamientos fueron las diferentes cepas aisladas, más dos tratamientos uno con fertilización nitrogenada (80 kg de N ha^{-1}) y un tratamiento (control) con medio de cultivo (infusión de papa) sin nitrógeno y sin microorganismo, cada tratamiento con cuatro repeticiones, en un diseño experimental completamente al azar, la unidad experimental fue una maceta con un volumen de 3.0 L la cual se llenó con suelo contaminado con rabia. Se evaluaron las mismas variables respuesta en los dos experimentos

4.5. Variables a evaluar.

Las variables respuesta a evaluar fueron; altura de planta, mediante un estadal graduado, el peso seco de follaje se puso a secar la planta en un horno de secado marca Felisa y concentración de macro nutrimentos en el follaje, re realizo mediante la técnica de digestión húmeda de incidencia y severidad de la enfermedad de la rabia fue por la técnica de escala y severidad JLSVVF (2008)

4.5.1. Altura de planta.

Para medir la altura de planta, se utilizó una regla graduada en el total de plantas, considerando como altura de la planta la longitud comprendida desde el cuello hasta el último brote, para obtener el promedio de altura, la que se reportó en (cm).

4.5.2. Peso seco de follaje.

En el peso seco de follaje, el follaje de las plantas correspondiente a cada unidad experimental se lavó y colocó en bolsas de papel estraza previamente

etiquetada. Éstas se introdujeron en un horno de secado con recirculación de aire a 70 ºC por 72 h, posteriormente se pesaron en una balanza granataria Marca OHAUS digital para cuantificar el peso seco en (g). Posteriormente el follaje fue molido para su análisis de concentración nutrimental.

4.5.3. Análisis foliar.

Este análisis se realizó en el Laboratorio de Nutrición Vegetal, perteneciente al CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. Técnica manual de análisis químico de tejido vegetal por Gabriel Alcantar y Manuel Sandoval del colegio de postgraduados, a continuación se describe. El material vegetal (hojas) se colectó a los 50 dds (días después de siembra).

Para el análisis de concentración de macro nutrimentos en las plantas de garbanzo, en cada tratamiento por repetición, se utilizó el follaje completo de la planta, se guardaron en bolsas de papel estraza etiquetadas y perforadas para evitar la reproducción de hongos. Cada bolsa con la muestra fue sometida en horno FELISA® a 70°C por 72h. Las muestras fueron trituradas en un molino eléctrico Thomas® y guardadas en sobres de papel. Posteriormente se pesaron los diferentes tratamientos con muestra en polvo en una balanza analítica Adam® y se realizaron los análisis de digestión húmeda correspondientes para cada elemento.

4.5.3.1. Digestión húmeda para determinar: N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn

En la digestión húmeda para nitrógeno (N) se colocó una cantidad de 0.1 g de muestra en matraces kjeldahl y se agregó 1.5 mL de mezcla de ácido sulfúrico y salicílico hasta homogenizar el material. Una vez finalizado el tiempo de reposo de la muestra (8 hr aproximadamente) se adicionaron 0.2 g de mezcla de sulfatos para ser digeridos en los digestores Labconco® a una temperatura no mayor de 360 °C. Se consideró terminada la digestión una hora después de que la solución presentó una coloración verde clara, y se dejó enfriar agregando 10 mL de agua destilada (Graham, *et, al* (1970)

La digestión húmeda para los demás nutrimentos (P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn) consistió en pesar 0.5 g de muestra vegetal previamente secada y molida se pasaron a matraces Kjeldahl de 100 mL. A los cuales se les adicionaron 10 mL de ácido nítrico y se dejaron reposar por 30 minutos. Una vez

transcurrido el tiempo, se adicionaron 1.5 mL de ácido perclórico y 2.0 mL de ácido sulfúrico. Al homogenizarse la muestra con los ácidos, cada matraz fue colocado en el digestor Labconco® previamente calentado aumentando la temperatura progresivamente sin exceder los 300 °C cuidando que no se evaporara totalmente la muestra hasta que presentara una coloración totalmente clara y un volumen aproximado de 1.5 y 3 mL. Las digestiones fueron enfriadas y transferidas cuantitativamente a matraces volumétricos de 25 mL, una vez aforados con agua destilada fueron filtrados en papel de poro cerrado (Whatman No. 42). A partir de la solución obtenida se realizaron diluciones de acuerdo a cada elemento, antes de continuar con su respectivo análisis.

4.5.3.1.1. Destilación de Nitrógeno total (NT).

El proceso de destilación, se inició adicionando 10 mL de NaOH (50%) antes del calentamiento. La destilación se recibió con una mezcla de 20 mL de ácido bórico (4%), 0.2 mL de verde de bromocresol llevándolo a un volumen de 50 mL. Para determinar nitrógeno también fue necesario realizar una titulación a cada muestra (adicionando un blanco y un testigo), la cual consistió en una solución de H_2SO_4 al 0.05 N hasta observar un cambio de coloración a rosa claro, dicho análisis se realizó por la técnica microkjeldahl y Finalmente se realizaron los cálculos de acuerdo a la fórmula:

%N Total: mL H_2SO_4 x N del H_2SO_4 x1.4/0.1g de muestra.

4.5.3.1.2. Determinación de Fósforo (P).

Para determinar fósforo, a partir de la solución filtrada, se transfirió una alícuota de 1 mL a matraces volumétricos de 25 mL a los cuales se les agregaron 0.5 mL de ácido nítrico 1:2, 0.5 mL de solución vanadato de amonio (0.25%) y 0.5 mL de solución de heptamolibdato de amonio (5%). Esta mezcla se aforó y con agua destilada y se dejó reposar durante 30 minutos antes de ser leído en espectrofotómetro de luz UV ThermoSpectronic® (Génesys 20) a 470 nm. Este elemento se expresa en porcentaje por lo tanto se empleó la siguiente fórmula para calcularlo: % P=

$$\% P = \frac{\text{Lectura de transmitancia x Vol. Digestión x Vol. Dilución x 100}}{\text{Pendiente x Peso de la muestra (g) x Alícuota}}$$

4.5.3.1.3. Determinación de Potasio (K).

Después de la digestión húmeda se transfirió 1 mL de dicha solución a matraces volumétricos de 50 mL y se aforó con agua destilada. A partir de aquí, las muestras fueron leídas en flamómetro Buck Scientífic® (PFP-7) a una absorbancia de 766.5 nm y expresadas en porcentaje de acuerdo a la fórmula siguiente: %K= (Lectura de transmitancia) (Volumen de digestión) (Volumen de dilución) (100) / (Pendiente) (Peso de muestra en g) (Alícuota).

$$\% K = \frac{\text{Lectura de transmitancia x Vol. Digestión x Vol. Dilución x 100}}{\text{Pendiente x Peso de la muestra (g) x Alícuota}}$$

4.5.3.2. Determinación de Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Fierro (Fe), Manganeso (Mn), Cobre (Cu) y Zinc (Zn).

Para calcio y magnesio se tomó muestra partir de la dilución realizada de la digestión, se tomó una alícuota de 1 mL en matraces volumétricos de 25 mL aforado con agua desionizada. Posteriormente se realizó una segunda dilución en la que se colocó 1mL en matraces de 10 mL aforado con agua desionizada. Para determinar micronutrimentos (fierro, cobre, manganeso y zinc). La lectura fue directamente de la digestion inicial. Fueron registradas mediante espectrómetro de absorción atómica Varian® (SpectrAA 50B) y calculadas en porcentaje de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% Ca, Mg = \frac{\text{Absorbancia x Vol. Digestión x Vol. Dilución x 100}}{\text{Pendiente x Peso de la muestra (g) x Alícuota}}$$

$$\% Fe, Cu, Mn y Zn = \frac{\text{Absorbancia x Vol. Digestión x Vol. Dilución x 100}}{\text{Pendiente x Peso de la muestra (g) x Alícuota}}$$

4.6. Incidencia y severidad de la enfermedad rabia.

ESCALA	SINTOMA
0	Planta sana
1	Planta con cuello de tallo necrosado
2	Planta con 30% de follaje necrosado
3	Planta con 50% de follaje necrosado
4	Planta muerta

4.7. Análisis estadístico.

Para el análisis de datos obtenidos en la experimentación de peso seco de follaje, altura de planta y concentración de macronutrimentos en follaje, se empleó un análisis de varianza ANOVA. Para el análisis de las diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó una prueba de comparación de medias de (Tukey $\alpha \leq 0.05$). Dichos análisis se realizaron en el software estadístico SAS versión 9.0.

4.8. Identificación morfológica de *Bacillus* y *Trichoderma*.

Para identificar morfológicamente a *Bacillus*, se sembraron los aislados en placas con medio de cultivo AN. Se incubaron a 37 °C por 24 horas. De las placas con crecimiento se tomaron muestras seleccionando las colonias con características del género *Bacillus* de acuerdo al Manual de Clasificación de Bergey (Claus y Berkeley, 1986). Posteriormente se pasaron a placas por agotamiento para su purificación. Los aislados se sometieron a una prueba de tinción de Gram y se observaron con un microscopio biológico para comprobar la pureza y determinar las características micro morfológicas y tintoriales de los mismos, así como la presencia de esporas.

Los aislados del género *Trichoderma* fueron sembrados en placas petri en medio de cultivo PDA, y se identificaron morfológicamente mediante el reconocimiento de sus estructuras macroscópicas (color de micelio, forma de micelio y crecimiento). Posteriormente, se prepararon muestras frescas de micelio sobre portaobjetos para observar sus estructuras microscópicas (hifas, esporas, clamidosporas) en un microscopio epifluorescente. Las características macro y microscópicas fueron comparadas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972); Bisset (1991) y Von Arx (1981).

4.9. Identificación molecular de *Bacillus* y *Trichoderma.*

Las cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* seleccionadas como antagonistas a la enfermedad “rabia” garbanzo, se identificaron molecularmente, iniciando con la extracción de los diferentes aislados con el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del aislado se amplifico el gen 16S

empleando los oligonucleótidos F2C y C (White *et al* 1990). Los productos de PCR amplificados se secuenciaron bidireccionalmente. Las secuencias fueron editadas en el software y comparadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el software BLAST-N y el algoritmo Megablast.

4.9.1. Análisis molecular.

Este análisis de identificación molecular se realizó en el LANGEBIO, del CINVESTAV- Irapuato. Los aislados preservados en arena, fueron sembrados sobre medio de cultivo PDA. A los 15 días después de la siembra del hongo en las placas y cuando las colonias estaban bien desarrolladas se procedió a extraer el ADN.

4.9.2. Extracción de ADN de candidatos *Bacillus*.

Para la extracción de ADN de la cepa candidata a *Bacillus* se inocularon 5 mL de medio LB fresco y se incubo a 37 °C en agitación toda la noche, se obtuvo un pellet por centrifugación (10 min, 8000 rpm, RT) y este pellet se trató para la extracción de ADN utilizando el kit MO BIO's PowerSoil DNA Isolation según las recomendaciones del fabricante), en el último paso, el ADN se resuspendió en 50 µL de agua millipore.

4.9.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Bacillus*.

Una vez que contamos con el ADN bacteriano, se amplificó la región V3-V4 del gen ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2 U μL^{-1}) una polimerasa high fidelity, para evitar la introducción de algún polimorfismo. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µL, de los cuales 10 µL son buffer, 1.5 µL de ADN genómico, 2.5 µL de oligo 515F1 (10 µM) y 2.5 µL de oligo 806R1 (10 µM), 1 µL de dNTPs (10 µM), 0.5 µL de Taq y 32 µL de agua. Las condiciones de PCR consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 98°C durante 1 min, seguidos por 34 ciclos a 98°C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por un minuto y una extensión final de 72 °C por 10 minutos.

Los oligos utilizados en este trabajo fueron 515F/806R (Caporaso *et al.,* 2011), los cuales amplifican un fragmento de 460 pares de bases aproximadamente de la región V3-V4 del gen ribosomal 16S.

4.9.4. Extracción de ADN de candidatos *Trichoderma*.

Para extraer ADN del micelio de *Trichoderma*, se creció en una caja con medio PDA, a esta caja se le colocó papel celofán estéril previamente lavado en agua caliente para quitar los azucares que pudiera contener, así que el micelio creció sobre el papel celofán, este micelio se trituró en mortero con nitrógeno líquido, fue transferido a un tubo Eppendorf y se procedió con el protocolo de extracción de ADN de *Trichoderma*.

A cada una de las muestras maceradas se agregaron 500 µL de Buffer TNES, se mezcló en vortex por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1); se mezcló por 5 min en vortex, se centrifugó a 12 rpm por 15 min, se recuperó la fase acuosa y se adicionó RNAseA 5µL, después se incubó a 37 °C por 30 min, se repitió el paso 3 y 6 sin RNAseA, se agregó 1 vol (cloroformo:isoamilico), se mezcló en vortex por 5 min y centrifugó a 12 rpm durante 15 min, nuevamente se recuperó la fase acuosa y se agregaron 0.8 vol de isopropanol y se mezcló suavemente, se centrifugó a 12 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado (dos veces) con etanol al 70%, se centrifugó a 12 rpm por 10 min en cada lavado y se dejó secar a RT para finalmente las muestras ser resuspendidas en 30 µL de agua estéril MQ (Gibco, cat. 10977-015).

4.9.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *Trichoderma.*

Una vez que contamos con el ADN del hongo, se amplifico la región ITS mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando Phusion Hot Start II DNA Polymerase (2UµL^{-1}) una polimerasa high para evitar la introducción de algún polimorfismo. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µL, de los cuales 10 µL son buffer, 1.5 µL de ADN genómico, 2.5 µL de oligo ITS9F2 (10 µM) y 2.5 µL de oligo ITS4R2 (10 µM), 1 µL de dNTPs (10 µM), 0.5 µL de Taq y 32 µL de agua. Las condiciones de

PCR consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 98 °C durante 1 min, seguidos por 34 ciclos a 98°C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por un minuto y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Para cada muestra se realizó PCR por duplicado y se mandaron a secuenciar por secuenciación Sanger usando el oligo F y el oligo R, para tener un total de 4 secuencias por muestra.

4.9.6. Análisis de las secuencias de *Trichoderma*.

Las muestras se enviaron al Laboratorio de Secuenciación de CINVESTAV-Irapuato y una vez que estas se determinaron se comparó su homología con las de la base de datos del GenBank utilizando el programa Blast del NCBI (National Center for Biotechnology).

4.10. Preparación de las compostas.

Consistió en preparar una composta Bocashi de manera tradicional con estiércol de vaca, tierra, carbón, melaza, levadura, salvado de trigo, cal y leche. Se hicieron las mezclas se taparon con un platico y se deja reposar durante 60 días para que termine el composteo, cuidando que la temperatura no subiera de 50°C.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Propágalos de hongos fitopatógenos en el suelo.

Los resultados del suelo con patógenos que provocan rabia en garbanzo, utilizado en macetas en los experimentos, fue de presentar más de un propágalo por gramo de suelo, de los hongos fitopatológicos de *fusarium*, *rizhoctonia* y *macrophomina* y no se encontró presencia de *phytium* ni *sclerotium.*

5.2. Selección de cepas de *Bacillus* como antagonistas a los patógenos causantes de la rabia en garbanzo.

Peso seco de follaje y altura de planta en experimento de invernadero de selección de cepas de *Bacillus*.

El tratamiento con mayor producción de peso seco de follaje fue el tratamiento 11 (B12) con 1.77 g, el cual presentó diferencia significativa solamente con el tratamiento 7 (B8) con 0.30 g, y el tratamiento 11 (B12) no presentó diferencias significativas con los demás tratamientos, le siguió en rendimiento de peso seco de follaje el tratamiento 4 (B4) con 1.60 g. En altura de planta el tratamiento que obtuvo la mayor altura fue el tratamiento 4 (B4) con 49.25 cm y presentó diferencia significativa con los tratamientos 1, 2, 5, 7, 8 y 9. Estos resultados se pueden observar en el Cuadro 2 . Los dos mejores cepas de *Bacillus* (B12) y (B4) se utilizaron en la evaluación con composta y *Trichoderma* en el control de la enfermedad “rabia“.

Cuadro 2. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje y altura de planta en el experimento de selección de cepas de *Bacillus* en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	Peso seco de follaje	Altura de Planta
		(g)	(cm)
1	B1	1.26 ab	37.25 b
2	B2	0.72 ab	35.00 b
3	B3	0.55 ab	40.75 ba
4	B4	1.60 ab	49.25 a
5	B5	0.49 ab	38.00 b
6	B7	1.02 ab	39.75 ba
7	B8	0.30 b	35.50 b
8	B9	1.00 ab	39.00 b
9	B10	0.97 ab	35.25 b
10	B11	0.91 ab	40.50 ba
11	B12	1.77 a	43.75 ba
12	Testigo	0.57 ab	39.50 ba

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.3. Volumen y peso seco de raíz en experimento en invernadero de selección de cepas de *Bacillus*.

En la variable peso seco de raíz el mejor tratamiento fue el 4 (B4) 0.24 g y los tratamiento 1 (B1) con 0.17 g, y el 11 (B12) con 0.17 g fueron los que siguieron en peso seco de raíz. En el volumen de raíz el mejor tratamiento fue el 4 (B4) con 2.27 ml de volumen, siguieron los tratamientos 11 (B12) con 1.92 ml y el tratamiento 1 (B1) con 1.62 ml. Estos resultados los podemos observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Comparación de media de tratamientos en peso seco y volumen de raíz en el experimento de selección de cepas de *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	Peso seco de raíz (g)	Volumen de raíz (ml)
1	B1	0.17 ba	1.62 abc
2	B2	0.15 bc	1.32 bc
3	B3	0.14 bc	1.30 bc
4	B4	0.24 a	2.27 a
5	B5	0.13 bc	1.37 bc
6	B7	0.09 c	1.1 c
7	B8	0.10 bc	1.12 c
8	B9	0.11 bc	0.50 bc
9	B10	0.13 bc	1.42 bc
10	B11	0.1 bc	1.25 bc
11	B12	0.17 ba	1.92 ab
12	Testigo	0.10 bc	1.32 bc

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.4. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en el follaje de garbanzo en experimento de invernadero en la selección de cepas de *Bacillus*.

La mayor concentración de fósforo se obtuvo con el tratamiento 11 (B12) con 0.43 % de fósforo seguido por el tratamiento 1 (B1) con 0.41 %, estos tratamientos presentaron diferencia significativa solamente con el tratamiento 6 (B6) con 0.20 % de fósforo. En los demás macronutrimentos no se presentaron diferencia significativa entre tratamientos por lo que las cepas *Bacillus* aportaron fósforo como promotoras de crecimiento en garbanzo. Los resultados los podemos observar en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Comparación de media de tratamientos en concentración de N, P, K, Ca y Mg en el follaje de garbanzo en experimento de invernadero selección de cepas de *Bacillus*.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	B1	2.97a	0.41a	1.45a	1.36a	0.52a
2	B2	2.91a	0.38ab	1.35a	1.48a	0.53a
3	B3	2.85a	0.37ab	1.63a	1.42a	0.52a
4	B4	2.76a	0.29ab	1.48a	1.35a	0.38a
5	B5	2.17a	0.26ab	1.42a	1.22a	0.42a
6	B6	2.10a	0.20b	1.41a	1.24a	0.45a
7	B7	2.70a	0.34ab	1.40a	1.49a	0.51a
8	B9	2.96a	0.35ab	1.59a	1.51a	0.57a
9	B10	3.21a	0.34ab	1.59a	1.25a	0.39a
10	B11	2.25a	0.29ab	1.38a	1.27a	0.43a
11	B12	3.09a	0.43a	1.24ab	1.39a	0.43a
12	Testigo	2.10a	0.25ab	0.72b	1.24a	0.34a

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.5. Incidencia y severidad en la selección de cepas de *Bacillus*.

Escala de severidad

0	**Planta sana**
1	Planta con cuello del tallo con presencia de tejido necrosado
2	Planta con 30% de follaje necrosado
3	Planta con 50% de follaje necrosado
4	Planta muerta

Resultados por tratamiento y repetición en la incidencia y severidad de la enfermedad rabia en garbanzo.

TRATAMIENTO	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**
1	0	0	1	2
2	0	4	2	4
3	0	0	4	1
4	0	1	0	1
5	0	0	0	3
6	0	4	4	4
7	0	1	0	0
8	1	0	4	4
9	0	3	3	3
10	3	2	3	1
11	1	1	0	0
12 TESTIGO	4	2	2	3

Los mejores tratamientos fueron el 4 cepa (B4) y el 11 cepa (B12) con solamente 2 dos plantas, dos repeticiones con parte del cuello del tallo con tejido necrosado, además estos tratamientos presentaron los pesos secos de follaje más altos por tratamiento. El testigo presentó los mayores daños por rabia en garbanzo con dos plantas (dos repeticiones) con el 30 % follaje necrosado, otra planta con el 50% de follaje necrosado y una planta muerta esto puede observarse en la figura 1.

Tratamiento 4 *Bacillus* B4 Tratamiento11 *Bacillus* B11

Figura 1. Comparación de los mejores tratamiento de cepas de *Bacillus* con el testigo.

5.6. Selección de cepas de *Trichoderma* como antagonistas a los patógenos causantes de la rabia del garbanzo. Variables de peso seco de follaje y altura de planta en experimento de invernadero en la selección de cepas de *Trichoderma*.

Los tratamientos con mayor producción en peso seco de follaje de garbanzo fueron los tratamientos 1 cepa (C1), 9 cepa (C20) y 13 cepa (C24) con 1.33 g, 1.13 g y 1.26 g respectivamente, pero no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos estudiados. En altura de planta, los tratamientos con mayor altura de planta fue el tratamiento 1 (C1) con 43.25 cm de altura que presentó diferencia significativa solamente con los tratamientos 2 cepa (C1) con 31.0 cm, 7(C17) con 30.75 cm, 8(C19) con 35.5 cm y 12(C23) con 27.50 cm de altura estos resultados se observan en el Cuadro5.

Cuadro 5. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje, altura de planta, en el experimento de selección de cepas de *Trichoderma* para el control de rabia en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	Peso seco de follaje	Altura de Planta
		(g)	(cm)
1	C1	1.33 a	43.25 a
2	C6	0.58 a	31.00 bc
3	C7	0.11 a	34.00 abc
4	C8	0.54 a	39.00 abc
5	C15	0.90 a	39.00 abc
6	C16	0.77 a	36.75 abc
7	C17	0.52 a	30.75 bc
8	C19	0.49 a	30.00 bc
9	C20	1.13 a	35.5 abc
10	C21	0.76 a	38.79 abc
11	C22	0.72 a	38.00 abc
12	C23	0.58 a	27.50 c
13	C24	1.26 a	38.50 abc
14	C25	0.92 a	35.50 abc
15	C26	0.97 a	35.50 abc
16	Testigo	0.80 a	40.75 ab

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.7. Peso seco y volumen de raíz en experimento de invernadero en la selección de cepas de *Trichoderma*

El mayor peso seco de raíz se obtuvo con el tratamiento 9 (C20) con 0.19 g de peso, donde solamente se obtuvo diferencia estadística con los tratamientos 2 (C6) con 0.12 g , 5(C15) con 0.80g y 12 (C23) con 0.9 g de peso. En el volumen de raíz el con mayor volumen de raíz fue el tratamiento 4 (C8) con 2.05 ml de volumen y presentó diferencia estadística con los tratamientos 16 testigo con 1.20 ml, y a los tratamientos 2(C6) con1.02 ml ,3 (C7) con 1.12 ml,7 (C17) con 1.17 ml,8 (19) con 1.12ml ,12 (C23) con 1.17ml y 14 (C25) con 1.25 ml de volumen de raíz estos resultados se observan en el Cuadro 6.

Cuadro 6 Comparación de media de tratamientos en peso seco y volumen de raíz en el experimento de selección de cepas de *Trichoderma* para el control de rabia en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	Peso seco de raíz	Volumen de raíz
		(g)	(ml)
1	C1	0.14 abc	1.62 abc
2	C6	0.067 c	1.02 c
3	C7	0.11 abc	1.12 bc
4	C8	0.12 abc	2.05 a
5	C15	0.08 c	1.37 abc
6	C16	0.12 abc	1.32 abc
7	C17	0.10 abc	1.17 bc
8	C19	0.13 abc	1.12 bc
9	C20	0.19 a	1.87 ab
10	C21	0.13 abc	1.50 abc
11	C22	0.06 abc	1.35 abc
12	C23	0.09 bc	1.17 bc
13	C24	0.12 abc	1.62 abc
14	C25	0.18 ab	1.12 bc
15	C26	0.12 abc	1.25 abc
16	Testigo	0.11 abc	1.20 bc

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.8. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en el follaje de garbanzo en experimento de invernadero selección de cepas de *Trichoderma*.

La mayor concentración de nitrógeno se obtuvo con el tratamiento 2 cepa C6 con 3.82%, que presentó diferencia significativas con los tratamientos, 1 cepa 1 con 2.30%,5 cepa15 con 2.17%, 6 cepa 16 con 2.25%,10 cepa 21 con 2.31% y testigo con 2.07 % de nitrógeno. En fósforo la mayor concentración se obtuvo igualmente con el tratamiento 2 cepa C6 con 0.38% de fósforo, con diferencia estadística solamente con el tratamiento 6 cepa C16 con 0.20 %. En concentración de calcio el tratamiento con mayor concentración fue con el tratamiento 13 Cepa C24 con 1.54%, pero presentó diferencias significativa solamente con el tratamiento testigo que obtuvo 1.10% de calcio. En potasio y magnesio no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos estudiados. Estos resultados se observan en el siguiente Cuadro 7.

Cuadro 7. Comparación de media de tratamientos en concentración de N, P, K, Ca y Mg en el follaje de garbanzo en experimento de invernadero selección de cepas de *Trichoderma*.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	C1	2.30b	0.35ab	1.45a	1.36ab	0.49a
2	C6	3.82a	0.38a	1.36a	1.48a	0.53a
3	C7	2.85ab	0.37ab	1.63a	1.42ab	0.52a
4	C8	2.78ab	0.29ab	1.52a	1.27ab	0.3a
5	C15	2.17b	0.26ab	1.42a	1.22ab	0.42a
6	C16	2.25b	0.20b	1.41a	1.24ab	0.45a
7	C17	2.70ab	0.34ab	1.40a	1.49ª	0.51a
8	C19	2.96ab	0.35ab	1.59a	1.51ª	0.57a
9	C20	3.21ab	0.34ab	1.59a	1.25ab	0.39a
10	C21	2.31b	0.29ab	1.38a	1.27ab	0.43a
11	C22	2.62ab	0.26ab	1.17a	1.22ab	0.43a
12	C23	2.67ab	0.35ab	1.28a	1.43ab	0.54a
13	C24	2.46ab	0.34ab	1.43a	1.54a	0.52a
14	C25	2.78ab	0.29ab	1.54a	1.28ab	0.45a
15	C26	2.48ab	0.27ab	1.44a	1.34ab	0.41a
16	Testigo	2.07b	0.23ab	1.31a	1.10b	0.37a

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.9. Incidencia y severidad en la selección de cepas de *Trichoderma*.

Escala de severidad

0	Planta sana
1	Planta con cuello del tallo con presencia de tejido necrosado
2	Planta con 30% de follaje necrosado
3	Planta con 50% de follaje necrosado
4	Planta muerta

Resultados por tratamiento y repetición la incidencia y severidad de la enfermedad rabia en garbanzo.

TRATAMIENTO	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**
1	0	0	1	0
2	0	1	2	4
3	0	0	0	1
4	3	1	3	4
5	0	0	0	3
6	0	4	4	4
7	0	1	0	0
8	1	0	4	4
9	0	1	0	0
10	0	2	2	3
11	1	1	2	4
12	1	1	4	4
13	1	3	4	2
14	2	3	3	3
15	3	2	2	2
16 TESTIGO	4	2	2	2

Los tratamiento con menos daños por los patógenos del suelo fueron el 1 cepa C1, el 3 cepa C7 y el 9 cepa C20 con solamente 1 planta en cuello del tallo con ligero tejido necrosado cada uno, Además estos tratamientos presentaron el mayor peso seco de follaje, el testigo presentó 3 plantas con el 30 % de follaje necrótico y una planta necrosada totalmente (muerta) esto se puede observar en la Figura 2.

Tratamiento 1 cepa 1 *Trichoderma* Tratamiento 9 cepa *Trichoderma* 20

Figura2. Comparación de los mejores tratamiento de cepas de *Trichoderma* con el testigo.

5.10. Compostas enriquecidas con *Bacillus* y *Trichoderma* en el control de los patógenos causantes de la rabia del garbanzo.

5.10.1. Altura de Planta y peso seco de follaje.

El tratamiento 1 presentó el mayor peso seco de follaje fue con la cepa C1 (*Trichoderma* 1 más composta Bocashi) con un peso de 2.02 g, presentó diferencias significativas con los tratamientos 2, 4, 7, 10, 11, 12 y testigo. La cepa B4 (*Bacillus* 4) más Bocashi no presentó diferencias significativas con el tratamiento 1 y resalta el tratamiento 5 que consiste en solamente composta Bocashi que tampoco presento diferencia significativas con el tratamiento 1 asimismo los tratamientos 3 (*Bacillus* 4 más Bocashi), 6 (*Trichoderma* 1 más Lombricomposta), 8 (*Bacillus* 4 más lombricomposta) , 9 (*Bacillus* 12 más lombricomposta) y 13 (*Trichoderma*). En altura de planta el tratamiento con mayor altura fue el tratamiento 8 (*Bacillus* 4 más lombricomposta), que presentó diferencias significativas con los tratamientos 14 (*Trichoderma 20*) y testigo resultados que se observan en el Cuadro 8 siguiente.

Cuadro 8. Comparación de media de tratamientos en peso seco de follaje, altura de planta, en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	Peso seco de follaje	Altura de Planta
		(g)	(cm)
1	C1+Bocashi	2.02a	43.00abc
2	C20+Bocashi	0.69d	38.50abc
3	B4+ Bocashi	1.85abc	53.50a
4	B12+ Bocashi	0.99cd	40.00abc
5	Bocashi	1.16abcd	35.25abc
6	C1+LOMBRICOMPOSTA	1.92ab	48.50ab
7	C20+ LOMBRICOMPOSTA	0.73d	31.25abc
8	B4+ LOMBRICOMPOSTA	1.27abcd	56.25a
9	B12+ LOMBRICOMPOSTA	1.500abcd	47.75ab
10	LOMBRICOMPOSTA	0.97cd	38.50abc
11	B4	1.02bcd	42.75abc
12	B12	0.65d	30.75abc
13	C1	1.26abcd	36.50abc
14	C20	0.64d	18.25c
15	Testigo	0.60d	21.75cb

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.10.2. Peso seco de raíz y volumen de raíz en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo.

En peso seco de raíz el tratamientos con mayor peso seco fueron el tratamiento 1 (*Trichoderma* 1 más composta Bocashi), 3 (*Bacillus* 4 más Bocashi) , 6 (*Trichoderma* 1 más Lombricomposta) , 8 (*Bacillus* 4 más lombricomposta) y 11 (*Bacillus* 4) presentaron diferencias significativas conlos tratamientos 2,4,7, 10, 11,12, 14 y testigo. En volumen de raíces el tratamiento 1, presentó el mayor volumen y presentó diferencias significativas con los tratamientos 2, 7, 12, 14 y testigo. Estos resultados se observan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Comparación de media de tratamientos en volumen de raíz y peso seco de raíz, en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	Peso seco de raíz	Volumen de raíz
		(g)	(ml)
1	C1+Bocashi	1.47a	2.44a
2	C20+Bocashi	0.06d	1.02cde
3	B4+ Bocashi	1.16a	1.54abcde
4	B12+ Bocashi	0.12d	2.05abc
5	Bocashi	0.80d	1.37abcde
6	C1+LOMBRICOMPOSTA	1.32a	1.32abcde
7	C20+ LOMBRICOMPOSTA	0.80abcd	1.17bcde
8	B4+ LOMBRICOMPOSTA	1.32a	2.25ab
9	B12+ LOMBRICOMPOSTA	0.32bcd	1.87abcd
10	LOMBRICOMPOSTA	0.13d	1.50abcde
11	B4	1.21a	1.77abcde
12	B12	1.00a	1.17bcde
13	C1	0.93abc	2.16abc
14	C20	0.37bcd	0.62e
15	Testigo	0.25cd	0.80de

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.10.3. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo.

La mayor concentración de nitrógeno en el follaje se obtuvo con el tratamiento 3 y presento diferencias significativas con los tratamientos 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y testigo. En la concentración de fósforo, potasio, calcio y magnesio no se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos

Cuadro 10. Comparación de media de tratamientos en concentración de N, P, K, Ca y Mg en el experimento de compostas enriquecidas con *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de rabia en garbanzo.

Núm. de tratamiento	Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	C1+Bocashi	3.55abc	0.40a	1.58a	1.38a	0.49a
2	C20+Bocashi	3.50abc	0.38a	1.36a	1.48a	0.53a
3	B4+ Bocashi	3.92a	0.42a	1.64a	1.57a	0.54a
4	B12+ Bocashi	2.71bcde	0.29a	1.52a	1.27a	0.38a
5	Bocashi	2.25e	0.26a	1.42a	1.22a	0.42a
6	C1+LOMBRICOMPOSTA	3.63ab	0.29a	1.49a	1.25a	0.45a
7	C20+ LOMBRICOMPOSTA	2.70bcde	0.34a	1.40a	1.49a	0.51a
8	B4+ LOMBRICOMPOSTA	3.29abcd	0.31a	1.59a	1.51a	0.57a
9	B12+ LOMBRICOMPOSTA	2.84bcde	0.34a	1.59a	1.25a	0.39a
10	LOMBRICOMPOSTA	2.31de	0.29a	1.38a	1.27a	0.43a
11	B4	2.55cde	0.26a	1.17a	1.22a	0.43a
12	B12	2.67bcde	0.35a	1.28a	1.43a	0.54a
13	C1	2.60cde	0.34a	1.43a	1.54a	0.52a
14	C20	2.58cde	0.29a	1.54a	1.28a	0.45a
15	Testigo	2.48de	0.27a	1.44a	1.34a	0.41a

Medias con letra iguales en cada columna no presentan diferencia significativa según, Tukey ($P \leq 0.05$)

5.10.4. Incidencia y severidad en experimento de compostas enriquecidas con *Bacillus* y *Trichoderma* en el control de la enfermedad rabia en garbanzo.

Escala de severidad

0	Planta sana
1	Planta con cuello del tallo con presencia de tejido necrosado
2	Planta con 30% de follaje necrosado
3	Planta con 50% de follaje necrosado
4	Planta muerta

Resultados por tratamiento y repetición la incidencia y severidad de la enfermedad rabia en garbanzo.

TRATAMIENTO	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**
1	4	0	3	3
2	0	1	2	4
3	0	0	0	1
4	3	1	4	4
5	0	0	1	3
6	0	3	0	0
7	0	1	3	0
8	1	0	0	4
9	0	4	0	4
10	0	0	1	4
11	0	0	1	4
12	0	0	4	4
13	0	3	4	2
14	0	4	4	4
15 TESTIGO	4	2	2	2

Los tratamiento que presentaron menor severidad a la enfermedad rabia fueron el 3 (*Bacillus* 4 más Bocashi) y el 6 (*Trichoderma* C1 más lombricomposta) con solamente 1 planta con daños, comparando con el testigo que presentó 3 plantas con el 30 % de la planta necrosada y una planta necrosada (muerta) en general las plantas de garbanzo presentaron mayor peso seco de follaje y menor incidencia en número de plantas dañadas por los patagones que causan rabia en comparación con solamente las cepas en los experimentos de selección de *Bacillus* y *Trichoderma*.

Figura 3 Comparación de las compostas enriquecidas con *Bacillus* y *Trichoderma* comparado con el testigo.

5.11. Identificación morfológica de candidatos *Bacillus*.

Los aislados bacterianos se identificaron morfológicamente, y de acuerdo al Manual de Clasificación de Bergey (Claus y Berkeley, 1986), mostraron las características típicas del género *Bacillus*, como son: colonias blanquecinas, opacas, aplanadas de bordes irregulares y características microscópicas típicas: formas bacilares y formadoras de endosporas.

Según, Brock (1997) las bacterias del género *Bacillus* son Gram positivas de forma bastón y pertenecen a la familia *Bacillaceae, s*e caracterizan por formar esporas bacterianas y presentan forma alargada de bastón o báculo, de donde proviene su nombre, entre otras características. Estas bacterias forman largas cadenas de células, algunas especies son móviles por medio de flagelos, la esporulación ocurre cuando se agotan los nutrientes del medio donde crecen, denominándose esporangios o endosporas a las células con esporas.

5.12. Identificación molecular de candidatos *Bacillus*

5.12.1 Análisis de las secuencias de *Bacillus.*

Se identificaron molecularmente la aislado candidatos *Bacillus* seleccionados en el experimento de invernadero, como antagonista a patogenos del suelo que provocan rabia en garbanzo. Las secuencias obtenidas de los aislados bacterianos se compararon en la base de datos GenBank.

A continuación se muestra el consenso de las 4 secuencias de cada línea:

CONSENSUS 16S B4
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACT
GACGCTGAG

La secuencia de 16SB4 tiene un alineamiento del 100% con *Bacillus pumilus* strain AB25A-SW1 (ID: MG890227.1) de la secuencia de Gen Bank, el alineamiento presenta un e-value de o, esto sugiere que la cepa B4 es una bacteria del género *Bacillus*.

5.13. Identificación de *Trichoderma* en Microscopio Confocal.

Muestras de micelio se colocaron en Glicerol al 10% con el colorante fluorescente SCRI Renaissance 2200 (SR2200) en una proporción (1:2000),

Este colorante reconoce las uniones beta 1-4 y beta 1-3 de los polisacáridos de la pared de hongos.

5.14. Identificación molecular de candidatos *Trichoderma*.

5.14.1. Análisis de las secuencias de *Trichoderma*

Se identificó molecularmente candidato *Trichoderma* C1 seleccionado en el experimento de invernadero, debido a su efecto como promotores de crecimiento en garbanzo. Las secuencias obtenidas de los aislados fungicos se compararon en la base de datos GenBank.

A continuación, se muestra el consenso de la secuencias de cada línea:

CONSENSUS ITS C1

ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT
GCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTCGGCGT
TGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGG
TCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCG
CGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGAATATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGG
GGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTGCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAA
TACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCG
CATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACTTCTGAAATG
TTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT

El consenso de las dos secuencias amplificadas con los oligos ITS9F2 y ITS4R2 de C1 da un 100 por ciento de identidad con la secuencia MG738308.1 de GeneBank que corresponde a la secuencia ribosomal de una cepa de *Trichoderma harzianum* con un e-value de 5e-135.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron cepas de *Bacillus* y *Trichoderma* promotoras de crecimiento y antagonistas contra los patógenos del suelo que provocan la enfermedad “rabia” en el cultivo de garbanzo.

- ✓ La identificación molecular de la mejor cepa *Trichoderma* C1 la ubica como especie *harzianum.* Y la mejor cepa de *Bacillus* B4 correspondió a *Bacillus pumilus* con un alineamiento del 100% en ambos microorganismos secuenciados.

- ✓ Las compostas incrementaron el crecimiento en garbanzo y reducen la severidad por la enfermedad rabia en garbanzo, al obtenerse mayor peso seco de follaje y menor necrosis en tejido de la planta.

- ✓ La composta Bocashi presentó un mejor efecto protector contra los patógenos que provocan rabia en garbanzo.

VII. BIBILIOGRAFÍA

Armenta-Bojórquez A. D., García-Gutiérrez C., Camacho-Báez, J. R., Apodaca-Sánchez, M. A., Gerardo-Montoya, L. y Nava-Pérez E. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai 6:51-56.

Armenta B.A.D.,Ferrera-Cerrato R.,Trinidad S.A. y Volke H.V.1986. Fertilización e Inoculación con *Rhizobium* y Endomicorrizas (V-A) en Garbanzo Blanco (*Cicer arietinum L.*) en Suelos del Noroeste de México. Agrociencia (65) 141-160.

Bashan Y. and Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30, 1225-1228.

Bellapart, C. 1996. Nueva agricultura biológica en equilibrio con la agricultura química. Ediciones Mundi- prensa Barcelona, España. 298 pp.

Chena, G.R., Crispin, M.A. y Larrea R.E. 1981. Cultivo de garbanzo (Cicer arietinum L.) en producción de granos y forrajes. 2ª Ed. Editorial Limusa, México. Pp: 469-499.

Costacurta, A., and Vanderleyden, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 21:1-18.

Dart, P.j., Islam, R. y Eaglesham, A. 1975. The root Nodule simbiosis of Chickpea and Pigeonpea In; ICRISAT International Work-Shop in grain Legume. Begumpet Hyderabad, India, pp63-83.

Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Padrón-Corral, E. y Reyes-Valdéz, M. H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado por *Fusarium* spp., *R. solani* Kuhn, y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 24:105-114.

Guzmán-Plazola R. y Ferrera-Cerrato R. 1990. La endomicorriza vesiculo-arbuscular en las leguminosas.C.P.Montecillos, México.

Guerrero, A. 1996. El suelo, los abonos orgánicos y fertilización de los cultivos. Ediciones Mundi- prensa Bilbao, España. 206 pp.

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96:190-194.

Howell, C.R. 2006. Understanding the mechanisms employed by Trichoderma virens to effect biological control of cotton diseases. Phytopath. 96(2):178-180.

Hoyos C., L.M.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. 2009. Growth stimulation in bean (Phaseolus vulgaris L.) by Trichoderma. Biol. Control. 51:409-416.

INIFAP. 2010. Guia para la asistencia técnica. Valle de El Fuerte.Los Mochis.

México.

Papavisas GC y Davey ChB. (1959). Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. Soil Science. 88:112-117.

Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P., 2001. The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. *In* R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri (eds.). The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances in the Soil-Plant Interface. Marcel Dekker, New York, 1-17 p.

Pulido L. E, Medina N, Cabrera A. 2003. Biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) y cebolla (*Allium cepa* l.). i. crecimiento vegetativo. Redalyc. 24(1): 15-24.

Reyes I, Alvarez L, El Ayoubi H, Valery A. 2008. Selección y Evaluación de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Pimentón y Maíz. Bioagro. 20(1): 37-48.

Rives N, Acebo Y, Hernández A. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* l.). perspectivas de su uso en cuba. Redalyc. 28(2): 29 – 38.

Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology 56:845-857.

Tilak K, Ranganayaki N, Manoharachari C. 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). European Journal of Soil Science. 57(1):67-71.

Torriente D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en cuba. Scielo. 31(1): 1-10.

Thompson, L.M. y Troeh, R.F. 1978. Soils and soil fertility 4ª ed. Mc Graw-Hill. Book Company . New York.

Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y.; Valero, J.R. 2007. Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering J. 37:1-20.

Tisdale, S.L., and Nelson, W. 1996. Soil fertility and fertilizers. Edicion 2 th Macmillan Company. New cork, Estados Unidos. 694 pp.

Tan, K.H. and Napomombodi, V. 1979. Effect of diferent level of humic acids on nutrient content and growth of com (*Zea mays*). Plant and soil 51:283-287