

**Universidad Autónoma de Sinaloa  
Colegio de Ciencias Agropecuarias  
Facultad de Agronomía  
Doctorado en Ciencias Agropecuarias**



**TESIS:**

***“Bacterias y hongos rizosféricos nativos del centro de Sinaloa:  
promotores de crecimiento y agentes biocontrol de la fusariosis  
vascular en garbanzo”***

**Que para tener el grado de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias**

**PRESENTA:**

**LUZ DEL CARMEN OLIVA ORTIZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. TERESA DE JESÚS VELÁZQUEZ ALCARAZ**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ROGELIO SOSA PÉREZ**

**Culiacán, Sinaloa, México, diciembre de 2016**

## **ACTA DE APROBACIÓN**

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **LUZ DEL CARMEN OLIVA ORTIZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

### **DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

#### CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTORA

\_\_\_\_\_  
DRA. TERESA DE JESÚS VELAZQUEZ ALCARAZ

CO-DIRECTOR

\_\_\_\_\_  
DR. ROGELIO SOSA PÉREZ

ASESOR

\_\_\_\_\_  
DR. LEOPOLDO PARTIDA RUVALCABA

ASESOR

\_\_\_\_\_  
DR. TOMÁS DÍAZ VALDÉS

CULIACÁN, SINALOA, DICIEMBRE DE 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
REPOSITORIO INSTITUCIONAL

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culicám el día 13 del mes juio del año 2021, la que suscribe Luz del Carmen Oliva Ortiz alumna del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias con número de cuenta 1273274-5, de la Unidad Académica

Facultad de Agronomía, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Teresa de Jesús Velázquez Alcarás y de acuerdo al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor, cede los derechos del trabajo intitulado "BACTERIA Y HONGOS RIZOSFÉRICOS NATIVOS DEL CENTRO DE SINALOA: PROMOTORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES BIOCONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR EN GARBANZO", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigación, la que será titular del mismo, en forma conjunta o separada con el autor.

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de ésta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

En apego al Art. 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor Cedo el derecho de publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigación a la Universidad Autónoma de Sinaloa.

LUZ DEL CARMEN OLIVA ORTIZ

---

Nombre completo y firma



## UAS- Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

## DEDICATORIA

A Dios. Por darme el regalo de la vida y la fortaleza para salir adelante.

A mis padres. Por su amor y su ejemplo de honestidad y entereza, sin ellos no hubiera llegado hasta aquí.

A mis hijos, Ángel Jared, Mario y Rodrigo, que son lo más grande de mi vida, gracias por su apoyo, paciencia, amor y comprensión que tuvieron durante estos años de estudio.

A mis hermanos, por el regalo de existir en mi vida, por ser también mis amigos y confidentes.

*“La agricultura es la profesión propia del sabio, la más adecuada al sencillo  
y la más digna para todo hombre libre”*

*Cicerón...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, mi casa de estudios por tantos años, gracias por brindarme la oportunidad de superación personal y académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haber facilitado mi formación profesional, por el otorgamiento de la beca y la oportunidad de realizar la movilidad en otra institución.

Al Centro de Ciencias de Sinaloa, por haberme brindado su apoyo para realizar satisfactoriamente mis actividades de tesis en sus instalaciones.

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz, por sus sabios consejos, sus grandes enseñanzas, por su apoyo y acompañamiento en todo el proceso. Gracias por todo lo que pude aprender, no sólo en aspectos académicos sino en su instrucción de la vida.

Agradezco enormemente al Dr. Rogelio Sosa Pérez, por compartir sus conocimientos y su amplia experiencia como investigador en el área de Microbiología, del que he aprendido a tomar nuevas herramientas para mi formación profesional, así como por su inconmensurable apoyo en todas las fases de la investigación, pero sobre todo, por brindarme su amistad...Gracias Doctor.

Al Dr. Leopoldo Partida Ruvalcaba, por toda su colaboración en la logística, su atenta disposición durante todos estos años de trabajo, por su apoyo para alcanzar esta meta, expresándole un enorme reconocimiento por su calidad humana.

Al Dr. Tomás Díaz Valdés, por su acompañamiento incondicional y por compartir sin miramiento ni egoísmo toda su experiencia y conocimientos; por su apoyo, motivación y profesionalismo con sus comentarios siempre acertados, apoyándome en mi aprendizaje de investigación.

A mis compañeros de Doctorado: Jacobo, José Manuel, Silvia, Raymundo y Moisés, con quienes conviví cuatro años provechosos de mi vida; por su apoyo moral y su amistad... Gracias por los momentos de alegría compartidos.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1. Planteamiento del problema científico	3
1.1.2. Hipótesis	4
1.1.3. Objetivo general	4
1.1.4. Objetivos específicos	5
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
1.2.1. El cultivo del garbanzo	6
1.2.2. La fusariosis vascular y su distribución	9
1.2.3. Sintomatología de la enfermedad de fusariosis vascular	11
1.2.4. <i>Fusarium oxysporum ciceris</i> y el proceso de patogénesis	12
1.2.5. Manejo de la enfermedad de fusariosis vascular	19
1.2.5.1. Resistencia genética	20
1.2.5.2. Prácticas culturales	21
1.2.5.3. Control biológico	22
1.2.6. Mecanismos de acción de control biológico de hongos y bacterias rizosféricas	26
1.2.6.1. Antibiosis	26
1.2.6.2. Competencia	28
1.2.6.3. Parasitismo	30
1.2.6.4. Estimulación del crecimiento vegetal	31
1.2.6.5. Resistencia sistémica inducida	33
1.2.7. Bacterias rizosféricas: <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i>	35
1.2.8. El hongo rizosférico <i>Trichoderma</i>	43

CAPÍTULO II. CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO ( <i>Cicer arietinum</i> L.) POR ALGUNOS MICROORGANISMOS NATIVOS DE SINALOA, MÉXICO, BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO	53
2.1. INTRODUCCIÓN	55
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	56
2.2.1. Origen de los aislamientos	56
2.2.2. Activación de los aislamientos	56
2.2.3. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de los antagonistas frente a <i>Foc</i> raza 5	57
2.2.4. Producción del inóculo	58
2.2.5. Montaje del bioensayo en invernadero	58
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
2.3.1. Actividad antagónica de las cepas bacterianas y fúngicas	60
2.3.2. Efecto protector de los antagonistas bacterianos y fúngicos	64
2.3.3. Promoción del crecimiento por los antagonistas bacterianos y fúngicos	70
CAPÍTULO III. CEPAS DE <i>Trichoderma</i> sp. NATIVOS DE SINALOA COMO AGENTE BIOCONTROL DE LA RABIA DEL GARBANZO	75
3.1. INTRODUCCIÓN	76
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	79
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO IV. MORFOLÓGÍA Y BIOQUÍMICA DE ANTAGONISTAS MICROBIANOS Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE GARBANZO Y CONTROL DE FUSARIOSIS	89
4.1. INTRODUCCIÓN	91
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	93
4.2.1. Localización geográfica	93
4.2.2. Activación y caracterización de las cepas antagónicas microbianas	93
4.2.3. Confrontación <i>in vitro</i>	95
4.2.4. Preparación del inóculo	96

4.2.5. Germinación de semillas en laboratorio	96
4.2.6. Ensayo en campo	97
4.2.7. Tratamientos y diseño experimental en campo	97
4.2.8. Análisis estadístico	98
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
4.3.1. Caracterización de las cepas antagonistas	98
4.3.2. Distinción morfológica colonial	100
4.3.3. Identificación de las cepas bacterianas mediante su conducta bioquímica	99
4.3.4. Ubicación taxonómica de las cepas fúngicas	100
4.3.5. Confrontaciones <i>in vitro</i>	101
4.3.6. Efecto protector de las cepas antagonistas	104
4.3.7. Efecto estimulador del crecimiento vegetal de las cepas antagonistas	106
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES	109
CAPÍTULO VI. LITERATURA CITADA	110

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1.	Clasificación taxonómica del cultivo de garbanzo.	8
2.	Reacción a la enfermedad de las líneas diferenciales de garbanzo para las razas patogénicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> .	16
3.	Ubicación geográfica de las cepas de bacteriana y fúngicas antagonistas seleccionadas para ensayos <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> .	56
4.	Tratamientos para la evaluación del biocontrol de la marchitez en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero.	59
5.	Escala subjetiva para estimar el vigor, marchitez en follaje y cáncer de raíz en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero.	60
6.	Crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5, y porcentaje de inhibición de su crecimiento micelial por antagonistas microbianos rizosféricos de plantas de garbanzo a través de la técnica de cultivo dual.	61
7.	Efecto protector de los antagonistas microbianos sobre la fusariosis vascular del garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2012-2013).	65
8.	Efecto protector de los antagonistas microbianos sobre la fusariosis vascular del garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2013-2014).	66
9.	Efecto de la inoculación de semillas con antagonistas bacterianos y fúngicos en los parámetros de crecimiento de plantas de garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2012-2013).	70
10.	Efecto de la inoculación de semillas con antagonistas bacterianos y fúngicos en los parámetros de crecimiento y rendimiento de plantas de garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2013-2014).	72

11.	Escala de clases de antagonismo (Bell <i>et al.</i> , 1982).	80
12.	Escala de la capacidad antagónica (Elías y Aros, 1989).	81
13.	Escala subjetiva para evaluar el efecto protector de las cepas de <i>Trichoderma</i> en plantas de garbanzo.	81
14.	Respuesta de la inoculación de semillas con cepas de <i>Trichoderma</i> sp. y fungicida químico al vigor, marchitez en follaje y cáncer en raíz y tallo en plantas de garbanzo cultivadas en campo.	86
15.	Respuesta de la inoculación de semillas con cepas de <i>Trichoderma</i> sp. y fungicida químico al crecimiento, desarrollo y rendimiento en plantas de garbanzo cultivadas en campo.	87
16.	Análisis de fertilidad del suelo de la parcela experimental.	94
17.	Descripción de la morfología colonial de los antagonistas microbianos.	99
18.	Pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas antagonistas.	100
19.	Identificación taxonómica de las cepas bacterianas.	101
20.	Crecimiento radial <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum ciceris</i> raza 5, al ser inhibidos por los antagonistas.	102
21.	Protección de plantas de garbanzo por inoculación de semillas con cepas antagonistas contra la fusariosis vascular en condiciones de campo.	104
22.	Efecto en la germinación por la inoculación a las semillas de garbanzo con las cepas antagonistas.	106
23.	Comportamiento del crecimiento y rendimiento de plantas de garbanzo, cultivado en campo, por la inoculación de semillas con las cepas antagonistas.	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.	Crecimiento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. HRG-060, HRG-050 y <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5.	62
2.	Confrontaciones <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas rizosféricas contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5 (sembrado tres días previos a la inoculación).	64
3.	Reacción de las raíces de plantas de garbanzo variedad Blanco Sinaloa a la inoculación con <i>F. oxysporum ciceris</i> raza 5 y microorganismos antagonistas.	65
4.	Bioensayos de confrontación <i>in vitro</i> antagonistas fúngicos- <i>foc</i> raza 5.	82
5.	Mecanismos antagónicos por competencia por el sustrato de cepas fúngicas frente a <i>Foc</i> raza 5.	83
6.	Tiempo de contacto antagonista fúngicos-patógeno.	84
7.	Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp. HRG-050, HRG-060 y <i>Foc</i> .	84
8.	Crecimiento radial final de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Foc</i> raza 5.	85
9.	Antagonismo por pruebas de confrontación <i>in vitro</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5.	102

## RESUMEN

### “Bacterias y hongos rizosféricos nativos del centro de Sinaloa: promotores de crecimiento y agentes biocontrol de la fusariosis vascular en garbanzo”

Luz del Carmen Oliva Ortiz

La agricultura practicada actualmente, origina problemas de contaminación, debido al uso excesivo de agroquímicos, de ahí la importancia de encontrar alternativas que contribuyan a una producción agrícola sustentable, siendo una opción el empleo de microorganismos como agentes biocontrol de enfermedades. El garbanzo es un cultivo importante en Sinaloa, y es afectado por la fusariosis, cuyo principal agente causal es *Fusarium oxysporum ciceris* (*Foc*) raza 5. El objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de algunas cepas rizosféricas (T442, T3241, T162, 7A1, 751, HRG-050, HRG-060 y HRG-083), nativas del centro de Sinaloa, como agentes biocontrol de esta enfermedad, así como determinar su efecto promotor del crecimiento en plantas de garbanzo; estas cepas fueron aisladas previamente de la raíz de plantas de garbanzo, cultivadas en lotes con presencia de fusariosis. Estudios preliminares se efectuaron *in vitro*, evaluando el antagonismo mediante el PICR de cada antagonista contra *Foc*, mediante confrontación dual, en placas Petri, con medio de cultivo PDA, bajo un diseño completamente al azar. En invernadero se montaron bioensayos en los años 2013 y 2014, realizándose la siembra en macetas, bajo un diseño completamente al azar; en campo se estableció el experimento en 2014, donde los tratamientos se distribuyeron bajo diseño experimental de bloques completos al azar. Los tratamientos fueron basados en la inoculación de semillas de garbanzo con cepas bacterianas a una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> con las cepas fúngicas. Se determinó la morfología colonial, microscópica y caracterización bioquímica mediante catálogos y pruebas API, de los antagonistas que mostraron mejores resultados en invernadero en 2013. Mediante escalas subjetivas se evaluaron vigor de planta, marchitez en follaje y cáncer de raíz; asimismo, se determinó altura de planta (cm), diámetro de tallo (mm), verdor (SPAD), biomasa (g) y rendimiento (g planta<sup>-1</sup>). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, P<0.05). Las cepas fueron caracterizadas como *Bacillus subtilis* (T442), *Agrobacterium radiobacter* (751), *Pseudomonas* sp. (7A1) y *Trichoderma* sp. (HRG-050 y HRG-060), la identificación de T3141 no fue concluyente. HRG-060, HRG-050, T442 y 751 mostraron mayor efecto antagónico *in vitro*. Las cepas más efectivas en reducir la incidencia de la enfermedad en las plantas fueron HRG-060 (*Trichoderma* sp.) y T442 (*Bacillus subtilis*); el mayor efecto promotor de crecimiento fue proporcionado por HRG-060 y T442, pues incrementaron la germinación, verdor, biomasa y rendimiento del garbanzo. El uso de estos dos antagonistas (HRG-060 y T442), para el control de la fusariosis vascular del garbanzo es prometedor de acuerdo a las condiciones presentes en la zona centro de Sinaloa.

*Palabras clave:* *Trichoderma*, *Bacillus*, *Fusarium oxysporum*, cepas nativas

## ABSTRACT

### **Bacteria and fungi rhizospheric native to the center of Sinaloa: growth promoters and biocontrol agents of vascular fusariosis in chickpea**

**Luz del Carmen Oliva Ortiz**

Agriculture currently practiced, causes pollution problems due to overuse of agrochemicals, hence the importance of finding alternatives that contribute to sustainable agricultural production, being an option the use of microorganisms as biocontrol agents of disease. The chickpea is an important crop in Sinaloa, and it is affected by Fusarium wilt, whose main causative agent is *Fusarium oxysporum ciceris* (*Foc*) race 5. The aim of this study was to determine the potential of some rhizosphere strains (T442, T3241, T162, 7A1, 751, HRG-050, HRG-060 and HRG-083), native to central Sinaloa, as biocontrol agents of this disease, and determine its growth promoting effect of chickpea plants; these strains were previously isolated from the root of chickpea plants, grown in the presence of Fusarium wilt. Preliminary studies were carried out *in vitro*, evaluating the antagonism by PICR of each antagonist against *Foc* by dual confrontation, in Petri dishes, with PDA culture medium, under a completely randomized design. Greenhouse bioassays were mounted in 2013 and 2014, carried out planting in pots, under a completely randomized design; field experiment in 2014, where treatments were distributed under experimental design of randomized complete block design was established. The treatments were based on inoculation with bacterial chickpea seeds at a concentration of  $1 \times 10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> and  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> with the fungal strains. It was determined the colonial morphology, microscopic and biochemical characterization through catalogs and testing API, antagonists that showed better results in emissions by 2013. By subjective scales, plant vigor, wilting in foliage and root cancer were evaluated; Also, plant height (cm), stem diameter (mm), green (SPAD), biomass (g) and yield (g plant<sup>-1</sup>) were determined. The results were submitted to analysis of variance and multiple comparison test (Tukey,  $P < 0.05$ ). The strains were characterized as *Bacillus subtilis* (T442), *Agrobacterium radiobacter* (751), *Pseudomonas* sp. (7A1) and *Trichoderma* sp. (HRG-050 and HRG-060), identification of T3141 was inconclusive. HRG-060, HRG-050, T442 and 751 showed greater antagonistic effect *in vitro*. The most effective strains reducing the incidence of disease in plants were HRG-060 (*Trichoderma* sp.) and T442 (*Bacillus subtilis*); the largest growth promoting effect was provided by HRG-060 and T442, as they increased germination, green, biomass and yield of chickpea. The use of these two antagonists (HRG-060 and T442), for the control of Fusarium wilt of chickpea is promising according to the conditions present in the central area of Sinaloa.

*Keywords: Trichoderma, Bacillus, Fusarium oxysporum, native strains*

# CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.2. Introducción

La agricultura tecnificada practicada hoy en día, en general, está basada en el empleo de agroquímicos, que han permitido incrementar el rendimiento y calidad de cosecha, cubriéndose así, gran parte de las necesidades alimentarias. Sin embargo, las consecuencias de su aplicación ha sido funesta para el ambiente, pues su uso irracional, ha contaminado el suelo, agua, alimentos y medioambiente, originando un daño irreversible, creando problemas en la salud de los animales y del hombre; aunado a ello, estos productos incrementan los costos de producción impactando adversamente y de manera significativa, la sustentabilidad de la agricultura (Elkoca *et al.*, 2010; Moradi *et al.*, 2012; Naher *et al.*, 2014).

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 el biocontrol, el cual, se basa en el empleo de microorganismos antagonistas naturales, denominados agentes de control biológico, principalmente bacterias y hongos, contra patógenos que atacan a diferentes cultivos (López, 2011; Abdulkareem *et al.*, 2014), y podría ser un método alterno para su control (Ruano-Rosa y López-Herrera, 2009), además de ser ecológicamente seguro (Izzeddin y Medina, 2011).

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es un cultivo de gran importancia en la alimentación mundial. Su principal productor y consumidor es la India, con una cosecha de 9,356,250 t en el ciclo 2013-2014; ocupando México el octavo lugar de producción, al aportar 190,803 t en ese mismo ciclo (FAOSTAT, 2015). En Sinaloa, este cultivo también es relevante, siendo el principal productor y exportador de garbanzo del país, la superficie sembrada por esta leguminosa en 2014, fue de 61,600 ha, con una producción de 103,645 t (SIAP, 2015).

El rendimiento del garbanzo en el mundo, es afectado por diferentes enfermedades, presentándose una serie de padecimientos en la raíz que se conoce como complejo de enfermedades de Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR) en garbanzo, e incluye un número de enfermedades reconocidas por la severidad de los síntomas ocasionados en la raíz y sistema vascular de la planta (Jiménez, 2011). Entre ellas, la más importante es la fusariosis vascular, ocasionada principalmente por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*), siendo reportada en la mayoría de los países donde se cultiva garbanzo (Haware y Nene, 1982, Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). En México, *Foc* es el fitopatógeno más importante dentro del complejo de hongos que provocan la fusariosis vascular en este cultivo (Velarde-Félix *et al.*, 2013). Y en Culiacán, Sinaloa, es la enfermedad de mayor importancia, reportándose a *Foc* raza 5, como el patógeno más limitante de esta enfermedad (Velarde-Félix *et al.*, 2015). En los últimos años, las pérdidas debidas al ataque de *Foc* han variado desde un 10-30%, situación que preocupa a los productores, pues significa reducciones en volúmenes de exportación, incremento en costos de producción y disminución de la rentabilidad (Guerrero-Aguilar *et al.*, 2015).

Una opción empleada para el manejo de esta enfermedad es el uso de productos químicos, aumentando así los problemas de contaminación. Además los consumidores muestran una preferencia por productos agrícolas libres de agroquímicos debido a los efectos secundarios de estos sobre la salud humana y medio ambiente (Kupper *et al.*, 2010). Lo anterior evidencia la búsqueda de agentes de control biológico como una opción factible al uso de pesticidas en la agricultura.

En este tenor, se han realizado investigaciones sobre microorganismos antagonistas que pueden contribuir al manejo integrado de las enfermedades de los cultivos (Kupper *et al.*, 2010; Abdulkareem *et al.*, 2014). En el biocontrol de *F. oxysporum*, se han realizado estudios con diversos microorganismos rizosféricos en varios cultivos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Eshetu *et al.*, 2015). En investigaciones realizadas en garbanzo, se demuestra que diversos organismos del suelo afectan el desarrollo de *Foc* y además mejoran el crecimiento del garbanzo, e incluyen a bacterias clasificadas dentro del género de *Bacillus* y *Pseudomonas* así como

hongos del género *Trichoderma* (Karimi *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2012). Estos microorganismos son considerados como promotores del crecimiento vegetal (Cano, 2011).

Por otra parte, es un tema actual y de interés, el estudio de microorganismos antagonistas nativos, ya que uno de los principales problemas en la efectividad del combate biológico de hongos fitopatógenos, es la introducción de microorganismos no nativos en los ecosistemas, condición que puede volverse problemática cuando los agentes de combate biológico utilizados no se encuentran adaptados a las condiciones ambientales donde se van a aplicar (Calvo *et al.*, 2012); señalándose que el empleo de cepas comerciales, pudiera generar competencia o inhibición contra los organismos nativos, o simplemente, no prosperar su propagación dentro de la microbiota del suelo (Robinson *et al.*, 2009).

Lo anterior conlleva a que el biocontrol por microorganismos rizosféricos podría ser una alternativa viable para el control de la fusariosis vascular, siendo el objetivo de este trabajo evaluar en condiciones de laboratorio, invernadero y campo, el potencial antagonista de algunas cepas bacterianas y fúngicas nativas de Culiacán contra *Foc* raza 5, principal agente causal de la fusariosis vascular, así como estudiar su posible efecto como promotoras de crecimiento y rendimiento en plantas de garbanzo.

#### 1.2.1. Planteamiento del problema científico

Sinaloa ocupa el primer lugar en la producción nacional de garbanzo. El cultivo puede verse afectado por diversas enfermedades, siendo una de las más importantes la fusariosis vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, la cual limita su crecimiento y desarrollo, ocasionando pérdidas importantes en el rendimiento del cultivo. Esta enfermedad es difícil de controlar por su naturaleza monocíclica, así como por la fisiología y características del fitopatógeno. El uso de agroquímicos para su control ha sido una de las opciones más utilizadas por los agricultores, pero su empleo no ha sido exitoso, además, se ha demostrado que el uso irracional de estos productos tiene un efecto negativo en el medio ambiente y recursos naturales, así como en la salud de los animales y humanos. Por lo anterior,

se ha hecho inminente la búsqueda de alternativas amigables que contribuyan a minimizar el impacto negativo de estos productos sobre el medio ambiente. El control biológico se presenta como una alternativa ecológica y eficaz frente a los problemas causados por los fitopatógenos presentes en nuestro agroecosistema. Los microorganismos biocontroladores como hongos y bacterias, ofrecen buenas posibilidades como antagonistas de diversos hongos patógenos de plantas, entre ellos *Fusarium oxysporum ciceris*. Sin embargo, es conocido que la aplicación de productos comerciales para el control biológico, no han sido efectivos, ya que son elaborados con cepas provenientes de otras regiones edafo-geográficas.

Todo esto indica que existe la necesidad de encontrar una alternativa de control biológico que sea particular a la región, no obstante, el uso de microorganismos antagonistas para el tratamiento de *Foc* en Sinaloa, se ha estudiado y documentado poco.

En la presente investigación se planteó la siguiente interrogante:

¿Las bacterias y hongos rizosféricos nativos del centro de Sinaloa, pueden ser una alternativa de control biológico de la fusariosis, y de promover el crecimiento y rendimiento del garbanzo?

### **1.2.2. Hipótesis**

Las cepas microbianas rizosféricas nativas del centro de Sinaloa, funcionan como agentes biocontrol de la fusariosis vascular del garbanzo y a la vez son promotores del crecimiento y rendimiento del cultivo.

### **Objetivo general**

Determinar en condiciones de laboratorio, invernadero y campo el efecto protector contra la fusariosis vascular, así como su efecto promotor del crecimiento y rendimiento en plantas de garbanzo por cepas bacterianas y fúngicas rizosféricas nativas del centro de Sinaloa.

### 1.2.3. **Objetivos específicos**

- Evaluar *in vitro* el potencial biocontrolador de las cepas rizosféricas bacterianas y fúngicas, previamente aisladas, contra *Foc* raza 5, principal agente causal de la fusariosis vascular, mediante bioensayos de confrontación efectuados en laboratorio.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente, mediante catálogos y pruebas API, a las cepas antagonistas ensayadas.
- Valorar el efecto protector de las cepas antagónicas contra fusariosis, así como la estimulación del crecimiento y rendimiento de garbanzo cultivado en invernadero.
- Determinar el efecto protector de las cepas antagónicas contra fusariosis, así como la estimulación del crecimiento y rendimiento de garbanzo desarrollado en campo.

### 1.3. Revisión de literatura

#### 1.3.1. El cultivo del garbanzo

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las leguminosas más importantes del mundo junto con el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y chícharo (*Pisum sativum* L.), constituyendo una fuente sustancial en la alimentación humana y animal (De la Fe *et al.*, 2011; Jiménez, 2011); siendo uno de los cultivos con los que se inició la agricultura junto con el trigo, la cebada, lino, guisantes y lentejas (Ladizinsky y Adler, 1976; Zohary y Hopf, 2000). El origen del garbanzo se ubica en el sudeste de Turquía pues se ha determinado la presencia de diferentes especies anuales silvestres muy relacionadas con el garbanzo (Ladizinsky, 1975). Asimismo, De Miguel (1991), y De la Fe *et al.* (2011), mencionan que esta leguminosa pudo ser originaria de la zona suroeste de Turquía, en los límites con Siria de donde fue llevado a la India y países europeos.

Los informes más antiguos que existen sobre el empleo del garbanzo, datan del año 5450 A. C. y proceden de la localidad turca de Hacilar (De Candolle, 1883). En la India, su primera aparición data del año 2000 A. C. (De Miguel, 1991). Al respecto, Lev-Yadun *et al.* (2000), sostienen que el garbanzo cultivado tuvo su origen en el Oriente Cercano hace unos 10,000 años, en una área relativamente pequeña en el Kurdistán turco, y se originó a partir de su ancestro salvaje *C. reticulatus* (Ladizinsky y Adler, 1976; Lev-Yadun *et al.*, 2000).

Asimismo, Duke (1981), señala que las especies silvestres de *Cicer* se encuentran primordialmente en Turquía, Irán, Afganistán y Asia Central. Evidencias arqueológicas y botánicas sugieren que el garbanzo fue domesticado en Oriente Medio y ampliamente cultivado en la India, Cuenca Mediterránea y en Etiopía desde la antigüedad, extendiéndose posteriormente a América y Australia (van der Maesen, 1972).

En el transcurso de su dispersión y selección, el germoplasma de *C. arietinum* parece haberse diferenciado en dos acervos genéticos diferentes (Moreno y Cubero, 1978). Así pues, el garbanzo cultivado se divide en dos genotipos o grupos

morfológicamente diferentes: "kabuli" y "desi", en función de las características de las plantas como son: tamaño, forma y coloración de semilla (Kazan y Muehlbauer, 1991). El germoplasma "kabuli" está conformado por semillas grandes, redondeadas, de color crema con cubierta fina y lisa, las flores son blancas y no contienen antocianina. Y es consumido principalmente en la cuenca Mediterránea, el Cercano Oriente, México y recientemente en Estados Unidos y Canadá (Singh y Saxena, 1996; Singh y Virmani, 1996). Por el contrario, los garbanzos "desi" son semillas pequeñas, angulares y de color oscuro, u otros colores, con flores de color púrpura o rosas y contienen antocianina, consumiéndose fundamentalmente en el Subcontinente Indio (Muehlbauer y Singh, 1987; Singh y Saxena, 1996). La mayoría de los países productores de garbanzo cultivan el tipo "kabuli", aunque el 85% de la producción mundial es del tipo "desi", por ser éste el cultivado en la India, Pakistán, Este de África y en Australia (Guerrero, 1999).

La planta se cultiva en más de 33 países del sur y oeste de Asia, norte y este de África, sur de Europa, América y Australia; los países que más contribuyen a su cultivo son la India, Turquía y Pakistán, siendo la India el principal productor mundial (FAOSTAT, 2015). Los principales países exportadores de garbanzo son Australia, Canadá, Irán, México y Turquía (Reddy *et al.*, 2007).

El garbanzo ha formado parte de la dieta humana desde la antigüedad debido, principalmente, a su alto contenido en proteínas y a la adecuada proporción de grasas y de hidratos de carbono que poseen haciéndolo un alimento altamente energético (Gatel y Champ, 1998). Desde el punto de vista de la alimentación humana y animal, esta leguminosa ocupa el tercer lugar por su alto valor nutritivo y por su importancia en la dieta humana, atribuyéndole, además, cualidades curativas (Kumari *et al.*, 2008; Gaur *et al.*, 2010); por lo anterior, cada vez más es utilizado como un sustituto de proteínas de origen animal (Hossain *et al.*, 2010; Jukanti *et al.*, 2012). Su semilla presenta un contenido medio de proteína (20.3% a 28.2%) algo más bajo que el de otras leguminosas de grano, sin embargo, su proteína es de las más digeribles, siendo entre 21-26% proteína rica en lisina, y por tanto, de un excelente valor biológico (Gatel y Champ, 1998; Huisman y Vander Poel, 1994;

Jukanti *et al.*, 2012). Además, posee un contenido óptimo en hidratos de carbono (35 a 43%) y un contenido en grasa más alto que en otras leguminosas (3 a 6%) y es rica en ácidos grasos insaturados como el ácido oleico y linoléico, convirtiéndola en una semilla interesante para el consumo humano y la alimentación animal (Gil *et al.*, 1996); contribuyendo significativamente a la nutrición diaria en países como la India o Pakistán y en la región Mediterránea (Pushpamma y Geervani, 1987).

El garbanzo es una planta anual, autógama y diploide (Varshney *et al.*, 2013). Pertenece a las familias de las leguminosas (*Fabaceae*), que consta de 9 especies anuales y 35 perennes, de las que *C. arietinum* es la única especie cultivada (van der Maesen *et al.*, 2007; Atta y Shah, 2009), la cual está distribuida por todo el mundo (Robertson *et al.*, 1997), presentándose en el Cuadro 1, su clasificación taxonómica.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del cultivo de garbanzo.

Clasificación	taxonómica
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia	<i>Faboideae</i>
Tribu	<i>Cicereae</i>
Género	<i>Cicer</i>
Especie	<i>arietinum</i>
Nombre científico	<i>Cicer arietinum</i>
Nombre común	Garbanzo

(Fuente: van der Maesen, 1972)

En América, el principal productor de esta leguminosa es México; a nivel mundial es el octavo productor de este grano, dedicando una superficie de 81,262 ha, contribuyendo con 125,588 t a la producción mundial (FAOSTAT, 2015). En Sinaloa, este cultivo también es relevante, siendo el principal productor y exportador de

garbanzo del país, la superficie sembrada por esta leguminosa en el ciclo agrícola 2015, fue de 48,109 ha, con una producción de 77,286 t (SIAP, 2016).

### 1.3.2. La fusariosis vascular y su distribución

En varias partes del mundo, la siembra de garbanzo se ve frenada por los bajos rendimientos originados por la incidencia de diversos estreses abióticos y bióticos y puede verse severamente afectado por varias enfermedades de diversa etiología (Landa *et al.*, 2004b). Se han reportado alrededor de 115 patógenos que afectan el garbanzo, de ellos, solamente unos pocos causan daños económicos importantes llegando a ser limitantes de la producción en algunas áreas (Nene *et al.*, 1989).

Dentro de estas enfermedades se presenta una serie de padecimientos en la raíz que se conoce como complejo de enfermedades de Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR) en garbanzo, e incluye un número de enfermedades generalmente reconocidas por la severidad de los síntomas que ocasionan (Kraft *et al.*, 1994; Jiménez, 2011). La MPR en garbanzo también es conocido en la literatura fitopatológica como “wilt”, “wilt and root rot” o “wilt like disorders” y como agentes causantes de estas enfermedades han sido citados principalmente especies de hongos fitopatógenos, aunque también se mencionan virus, bacterias y nematodos; este complejo incluye gran número de enfermedades generalmente reconocidas por su sintomatología severa y se presenta en la mayoría de países de los cinco continentes donde se cultiva garbanzo, siendo responsable de importantes pérdidas de cosecha (Allen, 1983; Bhatti y Kraft, 1992; Kraft *et al.*, 1994). Aunque no hay información que precise las pérdidas causadas por esas enfermedades, sólo algunas de ellas se consideran económicamente restrictivas a nivel mundial (Nene y Reddy, 1987; Nene *et al.*, 1996).

Dentro de las enfermedades más citadas y los agentes causales más comunes de la MPR podemos citar a la fusariosis vascular originada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, podredumbre negra de raíz inducida por *Fusarium solani*, podredumbre seca de raíz causada por *Macrophomina phaseolina*, enanismo originado por el virus del enrollado

de la hoja del guisante y la rabia causada por *Didymella* (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a; Nene y Reddy, 1987; Jiménez-Díaz *et al.*, 1989c; Nene y Sheila, 1989).

La fusariosis vascular del garbanzo es la enfermedad más importante y ampliamente distribuida y severa de las que comprenden el complejo MPR en garbanzo (Nene *et al.*, 1996). Esta enfermedad ha sido diagnosticada en la mayoría de países donde se cultiva garbanzo, entre los que se encuentran Argelia, Argentina, Bangladesh, Chile, China, Colombia, Egipto, España, Estados Unidos, Etiopía, Hungría, India, Irán, Irak, Italia, Kenia, Malawi, México, Marruecos, Myanmar, Nepal, Pakistán, Perú, Rusia, Siria, Sri Lanka, Sudán, Túnez, Turquía, Perú, Unión Soviética y Uganda (Echandi, 1970; Stepanova, 1971; Kannaiyan, 1981; Haware *et al.*, 1986a; Phillips, 1988; Frisullo *et al.*, 1989; Halila y Strange, 1996; Nene *et al.*, 1996; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Esta enfermedad es causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato, y constituye la enfermedad más importante de las causadas por patógenos habitantes del suelo, la cual limita la producción de esta leguminosa en todo el mundo (Jalali y Chand, 1992; Landa *et al.*, 2004a; Navas-Cortés *et al.*, 2000b; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Las pérdidas anuales de rendimiento por esta enfermedad se han estimado entre el 10 y el 15% (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b; Jalali y Chand, 1992), o hasta del 40% (Bousslama, 1980). Sin embargo, las epidemias por fusariosis vascular pueden ser devastadoras, causando pérdidas del 100% de la producción en condiciones favorables (Halila y Strange, 1996; Navas-Cortés *et al.*, 1998, 2000b; Landa *et al.*, 2004). En particular, los ataques de la enfermedad son devastadores si se producen bajo condiciones de cultivo de alta temperatura y estrés hídrico durante las fases de floración y llenado de semilla (Bhatti y Kraft, 1992; Landa *et al.*, 2004a; Navas-Cortés *et al.*, 2000b; Sugha *et al.*, 1994).

En México, también este cultivo es afectado por diversos fitopatógenos, siendo *Fusarium oxysporum* el principal agente causal de la fusariosis vascular y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) uno de los más predominantes (Velarde-Félix *et al.*,

2013). Al respecto, Carrillo (2011), señala que dentro de la problemática que enfrenta el cultivo de garbanzo en Sinaloa, se puede mencionar la incidencia de enfermedades, de las cuales la rabia del garbanzo es de las más importantes, la cual es ocasionada por un complejo de hongos nativos del suelo como los son: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*), *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Rhizoctonia solani*.

En Culiacán, Sinaloa, México, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 ha sido reportado como el principal agente causal de la fusarios vascular (Velarde-Félix *et al.*, 2013; Velarde-Félix *et al.*, 2015). Confirmándose molecularmente que las razas fisiológicas de *Foc* que infectan al garbanzo en las zonas de cultivo del Noroeste de México son la raza 0 y la raza 5, sin embargo, la raza 5 fue detectada con mayor frecuencia que la raza 0 (Velarde-Félix *et al.*, 2015).

### 1.3.3. Sintomatología de la enfermedad

La fusariosis vascular del garbanzo se caracteriza por dos síndromes, denominados amarillez vascular y marchitez vascular, distinguibles entre sí tanto por los síntomas que los componen como por la cronología con que éstos desarrollan (Trapero-Casas, 1983). Ambos síndromes son consecuencia de infecciones vasculares en la planta, que llevan asociada una coloración castaño oscuro del xilema y ocasionalmente de la médula de la raíz, cuello y tallo de las plantas infectadas (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985a).

El síndrome de amarillez vascular se expresa con más lentitud que el de marchitez vascular y se caracteriza por el desarrollo progresivo de clorosis, amarillez y necrosis de los folíolos de las hojas inferiores, que progresan en la planta y dan lugar a la defoliación de ésta (Trapero Casas, 1983; Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985b). En experimentos en ambiente controlado, las plantas susceptibles que presentan el síndrome de amarillez vascular, generalmente no mueren antes de transcurridos 40 días desde la siembra en un suelo infestado artificialmente (Trapero-Casas, 1983).

El síndrome de marchitez vascular se caracteriza por un desarrollo rápido de flaccidez así como una clorosis verde mate en las hojas de cualquier parte de la

planta, con la posterior desecación de los foliolos. La flacidez es seguida por la desecación de hojas y tallos, que adquieren un color castaño claro. Los foliolos necrosados suelen quedar adheridos al raquis, y finalmente se produce la muerte de la planta (Trapero-Casas y Jiménez Díaz, 1986). En inoculaciones artificiales, la muerte de plantas susceptibles ocurre generalmente antes de transcurridos 20 días tras la siembra en suelo infestado (Trapero-Casas, 1983). Aunque ambos síndromes han sido asociados en la literatura con la fusariosis vascular del garbanzo, el más común y tradicionalmente reconocido en diversos países ha sido el de marchitez vascular (Narasimhan, 1929; Raheja y Das, 1957; Van der Maesen, 1972; Nene y Haware, 1980).

Por otra parte, Jiménez-Díaz *et al.* (1993), señala que las plantas afectadas de fusariosis vascular pueden mostrar un síndrome de marchitez vascular temprano a las pocas semanas después de la siembra o un síndrome de marchitez vascular tardío en etapas más avanzadas del ciclo de cultivo. La marchitez vascular temprana se caracteriza por la flacidez de las hojas seguida por una coloración verde-grisácea, desecación y colapso de la planta completa (Navas-Cortés *et al.*, 2000b); mientras que las plantas que muestran marchitez vascular tardía exhiben caída de los peciolos y foliolos, seguida del amarillamiento y necrosis del follaje (Haware *et al.*, 1986a). Aunque ambos síndromes son consecuencia directa de la infección vascular del patógeno, también pueden ser causados por otros patógenos de plantas, de manera que si no son diagnosticados correctamente pueden ser asignados de manera errónea como debidos a la fusariosis vascular (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato, es considerado como el principal agente causante de la fusariosis vascular del garbanzo, y es patogénico de especies de *Cicer* (Kaiser *et al.*, 1994), y ha sido descrita en todas las zonas geográficas del mundo donde se cultiva esta leguminosa (Jalali y Chand, 1992).

#### 1.3.4. ***Fusarium oxysporum ciceris* y el proceso de patogénesis**

Los hongos, generalmente, son organismos pequeños que producen esporas microscópicas. Son filamentosos, carecen de clorofila y tienen paredes celulares que

contienen quitina, celulosa, o ambas, existiendo más de 8,000 especies de hongos que atacan y enferman a las plantas (Agrios, 2007). Pertenecen al Reino *Fungi* del Dominio Eucariota, y se dividen en cinco Grupos o Phylum: *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Deuteromycota*, *Zygomycota* y *Ascomycota* (Schübler *et al.*, 2001).

Entre los hongos filamentosos, el género *Fusarium* es uno de los más importantes; y pertenece a *Phylum Ascomycota*, Clase *Euascomyces*, Orden *Hypocreales* y Familia *Hypocreaceae* (SlideShare, 2015). Este hongo fue descrito por primera vez por Link en 1809, existiendo datos desde el siglo XVI, basados en las descripciones de los aztecas, sobre la podredumbre que se presentaba en el maíz. Los primeros estudios sobre los problemas producidos por *Fusarium*, comenzaron a mediados del XIX, donde se estableció a este género como el agente causal de la podredumbre en papas almacenadas (Wollenweber y Reinking, 1935). Sin embargo, fue hasta finales del siglo XIX cuando se descubrió su importancia como causante de enfermedades en plantas y productor de toxinas (Torres *et al.*, 1998). Los primeros estudios que demostraron la patogenicidad de *Fusarium* en plantas vivas, se publicaron entre 1892 y 1899 (Booth, 1984).

*Fusarium oxysporum* constituye un amplio complejo de hongos anamórficos similares morfológicamente con múltiples orígenes filogenéticos (Baayen *et al.*, 2000; Bogale *et al.*, 2006). Este organismo produce tres clases de esporas:

- Microconidias: Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5- 12  $\mu\text{m}$  de largo por 2.5-3.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Y son frecuentes en el interior de los vasos de las plantas hospedantes que ha infectado (Nelson, 1981; Agrios, 2007).

- Macroconidias: Son las esporas típicas de *Fusarium*, están constituidas de tres a cinco células. Son esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la

célula basal alargada y la célula apical atenuada; las macroconidias tienen un tamaño de 27 a 46  $\mu\text{m}$  de largo por 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Nelson, 1981; Agrios, 2007).

- Clamidosporas: Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se establecen simples o en pares, terminales o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro; se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo, o en las macroconidias del hongo (Nelson, 1981; Agrios, 2007). Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Garret, 1977; Burgess, 1998).

Estos tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo en medio artificial y quizá también en el suelo, sobresaliendo las clamidosporas como las que perduran durante más tiempo en este sustrato (Apodaca-Sánchez, 2006).

*F. oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland, 1988). El género incluye tanto aislados fitopatogénicos como no patogénicos. Las formas patogénicas causan enfermedades vasculares y podredumbres corticales, y se agrupan en *formae specialis* en base a su gama de plantas susceptibles. Además, dentro de una *forma specialis* puede existir variación en la virulencia que sus miembros manifiestan sobre cultivares de su especie, dando lugar a la designación de patotipos y razas patogénicas (Kistler, 1997).

Las formas especiales (*f. sp.*), son cepas morfológicamente indistinguibles que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospedantes (Deighton *et al.*, 1962). Se pueden definir como un conjunto de cepas que atacan a una especie vegetal, o a lo sumo a unas cuantas especies de un mismo género (Booth, 1975). *F. oxysporum f. sp. ciceris* es una de las formas especiales de origen monofilético en el complejo de *F. oxysporum* (Demers *et al.*, 2014).

*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) es un hongo de suelo, necrótrofo obligado, patogénicamente especializado en especies de *Cicer*, a las que infecta vascularmente, y transmisible en semillas infectadas de *C. arietinum*, su huésped cultivado (Nene y Haware, 1980; Haware *et al.*, 1986a; Kaiser *et al.*, 1994). Puede invadir asintómicamente raíces de otras plantas, tanto leguminosas como no leguminosas, tales como: guisante, lenteja, haba, judía, melón, patata, remolacha azucarera, que proporcionan al patógeno un medio de sobrevivir parasíticamente durante periodos de tiempo en que el suelo permanece libre de su huésped cultivado (Haware y Nene, 1982a, Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b; Cabrera de la Colina *et al.*, 1987). Además, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, al igual que los agentes causantes de otras fusariosis vasculares, posee la capacidad de sobrevivir inactivo en el suelo en forma de clamidosporas durante varios años en ausencia de plantas huésped (Allen, 1983); hasta por más de 6 años (Haware *et al.*, 1986b).

*Foc* es un hongo de suelo que presenta dos patotipos: el patotipo de amarillez y el patotipo de marchitez, que inducen en cultivares de garbanzo susceptibles. El primero provoca un amarillamiento foliar progresivo con coloración castaño-oscuro del xilema y muerte tardía de la planta (Navas-Cortez *et al.*, 2000a). El patotipo de marchitez induce una rápida y severa clorosis, flacidez, decoloración vascular y muerte rápida de la planta. Para ambos síndromes, las partes subterráneas de las plantas afectadas no muestran síntomas externos (Jiménez-Gasco *et al.*, 2002; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Asimismo, la incidencia y la gravedad de la enfermedad son estimulados por la densidad del inóculo del patógeno y por la temperatura cálida en del suelo, así como por la susceptibilidad del cultivar de garbanzo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Los aislados pertenecientes a un patotipo pueden ser clasificados en razas patogénicas en base al patrón de reacciones que originan en un conjunto de cultivares, los cuales se muestran en el Cuadro 2. La primera descripción de razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es debida a Haware y Nene (1982b), quienes identificaron las razas 1, 2, 3 y 4. *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* muestra una gran variabilidad patogénica. Hasta la fecha, han sido descritas ocho razas del

patógeno denominadas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6, las cuales pueden ser agrupadas dentro de los patotipos de marchitez y amarillez basándose en los síntomas de enfermedad y cuya identificación se realiza tradicionalmente mediante pruebas de patogenicidad; las razas 0 y 1B/C inducen el patotipo de amarillez vascular y se consideran menos virulentas, las razas restantes provocan el patotipo de marchitez (Cabrera de la Colina *et al.*, 1985; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b; Haware y Nene, 1982b; Jiménez Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2002; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Por tanto, la raza 5 induce el síndrome de marchitez vascular en cultivares susceptibles, por cuya infección desarrollan un amarillamiento foliar lento y progresivo que es distinguible de la amarillez vascular causada por la raza 0 en cultivares susceptibles (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989b).

Cuadro 2. Reacción a la enfermedad de las líneas diferenciales de garbanzo para las razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*<sup>a</sup>.

Líneas diferenciales de garbanzo	Razas patogénicas							
	0	1A	1B/C	2	3	4	5	6
12-071/10054	S	M	S	R	R	R	R	M
JG-62	R	S	S	S	S	S	S	S
C-104	M	M	R/M	S	S	S	S	M
JG-74	R	R	R	S	M	M	M	R
CPS-1	R	R	R	S	M	M	M	R
BG-212	R	R	R	S	M	M	R	R
WR-315	R	R	R	R	S	R	R	R
ICCV-2	R	R	R	S	S	S	S	M
ICCV-4	R	R	R	S	S	S	S	M
P-2245	S	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup> La enfermedad se evaluó en una escala de 0-4 de gravedad, dependiendo del porcentaje de tejido foliar afectado (0= 0%, 1= 1-33%, 2= 24-66, 3= 67-100, 4= planta muerta) a los 40 días después de la siembra en suelo infestado. Las reacciones de enfermedad promedio de <1 y > 3 fueron consideradas resistente (R) y susceptible (S), respectivamente. Las reacciones de la enfermedad intermedias fueron consideradas moderadamente susceptible (M) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989b, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2004b).

Las razas 0, 1B/C, 5 y 6 se localizan principalmente en la Cuenca Mediterránea, y California (USA) (Jiménez-Gasco *et al.*, 2001; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz,

2003). La raza 1A está presente en India (Haware y Nene, 1982), California y la Cuenca Mediterránea (Jiménez-Díaz *et al.*, 1993; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001; Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003). Las razas 2 y 3 se han descrito en Etiopía, India y Turquía (Dolar, 1997; Shehabu *et al.*, 2008; Bayraktar y Dólar, 2012), mientras que de la raza 4 sólo ha sido descrita en Etiopía e India (Haware y Nene, 1982a; Shehabu *et al.*, 2008). Aunque en estudios recientes se señala la presencia de la raza 4 en Irak, así como las razas 0 1B/C y 5 (Al-Taae *et al.*, 2013).

La fusariosis vascular del garbanzo en el Noroeste de México, es ocasionada principalmente por las razas 0 y 5 de *Foc*, las cuales fueron identificadas por PCR, secuenciación de ADN y pruebas de bioensayos de genotipos diferenciales, detectándose la presencia de la raza 5 en más del 100% con respecto a la raza 0 (Velarde-Félix *et al.*, 2015). Sin embargo, en estudios realizados por Arvayo-Ortiz *et al.* (2011), se señalan además la presencia de las razas 1B/C y 6,

*Foc* puede invadir las plántulas de garbanzo de variedades tanto susceptibles como resistentes durante la germinación y emergencia, en los primeros días después de la siembra, sin necesidad de heridas en los tejidos subterráneos de la plántula. La penetración tiene lugar principalmente a través de los cotiledones y en menor proporción por zonas de la raíz principal, a excepción del ápice radical (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a). Al respecto, Jiménez-Díaz (1996) y Nelson (1981), señalan que la penetración de las formae specialis de *F. oxysporum* en sus plantas huésped tiene lugar directamente o a través de heridas; en ausencia de heridas, son varias las vías y modos de penetración de las plantas huésped incluyendo el meristemo radical, pelos radicales y diversas áreas de la raíz y de la semilla.

Asimismo, diversos investigadores señalan que el patosistema *Foc* inicia en la zona de inserción de los cotiledones y zonas próximas del epicotilo, constituyendo las principales vías de ingreso del patógeno en el tejido radical de las plantas de garbanzo (Basallote Ureba, 1987; Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a; Stevenson *et al.*, 1997). Una vez que *F. oxysporum ciceris* penetra la planta de garbanzo, el patógeno coloniza los espacios intercelulares del córtex hasta alcanzar el cilindro central (Stevenson *et al.*, 1997). Después del crecimiento del hongo a través del córtex

radical, tiene lugar la colonización vascular de la planta debido al crecimiento de las hifas a lo largo del eje vertical y al transporte de microconidias en los vasos del xilema, seguido de la colonización de los vasos adyacentes debido al crecimiento lateral del micelio a través de los poros laterales de aquéllos. Inicialmente, la colonización vascular se produce mediante el crecimiento de hifas delgadas en la raíz y base del tallo de la plántula. Posteriormente, se desarrollan hifas gruesas irregulares y ramificadas cuyo crecimiento profuso da lugar a la oclusión del lumen de los vasos infectados (Jiménez Díaz, 1994; Jiménez Díaz *et al.*, 1989a). Estudios posteriores en cultivos hidropónicos infestados mostraron que las razas 0 y 5 del patógeno colonizan la superficie de las raíces primarias y laterales en ambos cultivares susceptibles y resistentes, y preferentemente penetran en las células meristemáticas del ápice de la raíz (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a; Jiménez-Fernández *et al.*, 2013).

La colonización vascular de la planta ocurre de forma similar por los aislados del patógeno que causan el síndrome de amarillez vascular y el de marchitez vascular; sin embargo, los aislados causantes de amarillez vascular son menos virulentos que los de marchitez vascular e invaden la planta más lentamente y en menor extensión (Jiménez-Díaz, 1994). Para ambos tipos de aislados, los síntomas severos característicos se desarrollan después de la colonización intensa y extensa de los haces xilemáticos de la raíz y base del tallo por el hongo, y la distribución de éste a lo largo del eje de la planta (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989a; Jiménez-Díaz, 1994). La colonización sistémica a lo largo del eje central de la planta (es decir, la fase determinante de la patogénesis) es seguido por el desarrollo de los síntomas (es decir, la fase expresiva) entre los 10-20 días después de la inoculación (Jiménez-Fernández *et al.*, 2013). Abundantes clamidosporas se forman en los tejidos infectados y se desarrollan síntomas graves y de senescencia de las plantas. Eventualmente, estas clamidosporas se liberan en el suelo mientras se descomponen los desechos infestados. Las clamidosporas pueden someterse a ciclos de renovación por el crecimiento saprófito del hongo con el apoyo de desecho orgánico y exudado de la raíz, así como por las infecciones transitorias de hospederos y no hospederos. (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

El desarrollo de la marchitez por *Fusarium* en garbanzo puede ser influenciada por su agresividad (definida como la cantidad de la enfermedad causada por un genotipo de patógeno en un huésped dado) de las razas del patógeno, la densidad de inóculo del patógeno en el suelo, las condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura del aire y del suelo, humedad del suelo, el pH del suelo, etc.) y la susceptibilidad del cultivar (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). En investigaciones realizadas sobre el marchitamiento por *Fusarium* causado por una raza no identificada de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, se informó que este aumenta con la disminución del potencial mátrico del suelo y se desarrolla severamente entre 25 y 30 °C, pero no a los 15 y 20 °C, con una densidad de inóculo de 500 y 1,000 propágulos g<sup>-1</sup> suelo. No se desarrolló la enfermedad a 10 °C, incluso con una densidad de inóculo de 5,000 propágulos g<sup>-1</sup> suelo (Bhatti y Kraft, 1992).

#### 1.3.5. Manejo de la enfermedad

Tanto por la fisiología y características del fitopatógeno como por la epidemiología de la enfermedad, se sostiene que la fusariosis vascular del garbanzo es de naturaleza monocíclica (Jalali y Chand, 1992). En consecuencia, las estrategias más adecuadas para su control son aquellas que contribuyen a reducir la cantidad del inóculo inicial en el suelo, a reducir su eficacia o a ambas (Alabouvette, 1990; Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Diferentes enfoques basados en el manejo integrado de plagas se han desarrollado para reducir el uso de los pesticidas en el cultivo de diversos cultivos (Acebo *et al.*, 2012). Estos métodos se han desarrollado utilizando las técnicas de manejo que prevengan la presencia de los patógenos y también de suprimir sus poblaciones, haciendo énfasis en las técnicas no químicas, como las prácticas culturales, el control biológico y cultivares resistentes (Avendaño y Arbeláez, 2006). Como resultado, los nuevos sistemas de manejo del cultivo han dado lugar a una disminución del 65% del uso de plaguicidas en los últimos 10 años (Côte *et al.*, 2009).

La fusariosis vascular del garbanzo, como ocurre con la mayoría de las enfermedades causadas por patógenos de suelo es una enfermedad de difícil control, por ello el estudio de la biología del patógeno y su interacción con el huésped se presenta como un paso que podría contribuir al diseño de estrategias de control más eficientes, destacando la resistencia genética, las prácticas culturales y el empleo de biocontroladores (Nene y Reddy, 1987). Al respecto, Jiménez-Díaz y Jiménez-Gasco (2011), señalan que las medidas de control de la enfermedad deben incluir: (i) el uso de semillas libres de patógenos; (ii) la selección del sitio para evitar la siembra en suelos de alto riesgo; (iii) la reducción o eliminación de inóculo en el suelo; (iv) el uso de cultivares resistentes; (v) la protección de las semillas sanas de inóculo residente mediante el tratamiento de semillas con fungicidas o agentes de control biológico; y (vi) selección de las prácticas de cultivo para evitar condiciones que favorezcan la infección de la planta por el patógeno.

El manejo de la fusariosis de garbanzo se podría conseguir si se utilizan estos dispositivos de control de la enfermedad dentro de una estrategia de manejo integrado en una combinación simultánea o en secuencia (Haware *et al.*, 1990; Jiménez-Díaz y Jiménez-Gasco, 2011).

#### **1.3.5.1. Resistencia genética**

El método más práctico y económicamente eficiente para el control de la fusariosis vascular del garbanzo es la utilización de cultivares resistentes (Landa *et al.*, 2006a; Velarde-Félix *et al.*, 2015). Al respecto Nene y Reddy (1987), también señalan que la principal y más efectiva medida de control de la fusariosis vascular del garbanzo es el empleo de cultivares resistentes. Sin embargo, la efectividad y la utilización de este método de control puede ser limitada por la gran variabilidad patogénica de las poblaciones de *Foc* existente en suelos de cultivo, así como por las características agronómicas indeseables de algunos de los cultivares desarrollados, pudiendo limitar la eficacia y el empleo extenso de la resistencia disponible (Haware y Nene, 1982b; Jiménez-Díaz *et al.*, 1993).

El desarrollo de genotipos de garbanzo resistentes a esta enfermedad puede ser influido por factores como la genética de la resistencia en la planta y la variabilidad patogénica en el agente (Kaiser y Danesh, 1971). Aun así, se han conseguido desarrollar genotipos de garbanzo resistentes o tolerantes a enfermedades individuales (Abbo *et al.*, 2003). Cabe señalar que en muchos casos, el germoplasma resistente a una enfermedad se ha mostrado altamente susceptible a otras enfermedades importantes del cultivo (Singh, 1988). Ávila-Miramontes *et al.* (2015), señalan que para el control de la fusariosis vascular del garbanzo se han utilizado diferentes métodos, siendo el desarrollo de variedades resistentes uno de los más utilizados. Sin embargo, la gran complejidad de sus agentes causales y su transformación provocan que este sea de mediano a corto plazo (Fravel *et al.*, 2003).

#### **1.3.5.2. Prácticas culturales**

La rotación de garbanzo con cultivos no huéspedes puede contribuir a reducir el inóculo de sus patógenos que residen en el suelo (Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, el control de la fusariosis vascular mediante la rotación de cultivos no es efectivo debido a la capacidad del patógeno de sobrevivir prolongadamente en el suelo mediante clamidosporas, así como de infectar asintómicamente otros cultivos de plantas leguminosas y no leguminosas (Cabrera de la Colina, 1986; Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b). Sin embargo, el uso de la rotación de cultivos en el manejo integrado de la fusariosis vascular del garbanzo no debería de dejar de tomarse en cuenta ya que esta propuesta ayudaría a reducir el inóculo del suelo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

Por otra parte, investigaciones sobre la utilización combinada de tratamientos fungicidas de la semilla de variedades de garbanzo con resistencia diferencial al patógeno, indicaron que algunos fungicidas incrementan significativamente la emergencia de las plántulas y retrasan el comienzo de las epidemias en cultivares moderadamente resistentes, pero no en cultivares altamente susceptibles (Jiménez-Díaz y Trapero-Casas, 1985). Sin embargo, ningún tratamiento fungicida ha proporcionado un nivel de control satisfactorio de la enfermedad (Karimi *et al.*, 2012). Singh y Reddy (1991), reportan que la mayoría de las enfermedades fungosas del

cultivo pueden ser controladas con fungicidas, pero su empleo en ocasiones no es económicamente redituable. Por su parte, Ávila-Miramontes *et al.* (2015), sostienen que el uso de fungicidas en el tratamiento a la semilla es otra forma de reducir el impacto de esta enfermedad, aunque conlleva el deterioro del medio ambiente.

El manejo de las enfermedades de las plantas así como el incremento en los rendimientos utilizando pesticidas, herbicidas o fertilizantes químicos, no son prácticas respetuosas con el medio ambiente, pues su uso contribuye enormemente a la contaminación del agua, suelo y atmosfera y en ocasiones puede conducir al desarrollo de resistencia de fitopatógenos (Moradi *et al.*, 2012). Por ello, se buscan opciones alternativas, como el uso de agentes biocontrol (BCA), ya sea solo o en un enfoque integrado con otros productos químicos como métodos sustentables y respetuosos del medio ambiente para el manejo de las enfermedades (Naher *et al.*, 2014).

#### **1.3.5.3. Control biológico**

Las variedades resistentes, pesticidas químicos y prácticas culturales son las principales estrategias para el control de las enfermedades de las plantas, la más empleada es la aplicación de fungicidas químicos, pero su eficacia es variable (Ivana *et al.*, 2012). La tendencia a nivel mundial, impulsada principalmente por los consumidores, es exigir alimentos sanos, de alta calidad, cuya producción no constituya un peligro para la salud humana, para la salud animal ni para el medio ambiente (Naher *et al.*, 2014). Una de las maneras de satisfacer estos requerimientos es la utilización de insumos ecológicos en los diversos sistemas productivos, es decir, la utilización de insumos que tienen como característica bajo impacto ambiental, costos bajos y sin problemas de toxicidad, y cuyo uso no se limite solo a la agricultura orgánica (Zamanizadeh *et al.*, 2011; Pastrana *et al.*, 2016).

Una estrategia prometedora, alternativa al empleo de pesticidas químicos para el control de enfermedades y plagas de las plantas, ha sido la implementación del control biológico (Abdulkareem *et al.*, 2014). Asimismo, Zeilinger y Omann (2007), y Vinale *et al.* (2008a), sostienen que una alternativa al control químico de hongos

fitopatogénicos, es su supresión por el uso de agentes de control biológico, con énfasis en el uso de antagonistas nativos siendo una herramienta que no afecta al ambiente. Al respecto, Abdulkareem *et al.* (2014), señalan que el control biológico es una forma eficiente y respetuosa del medio ambiente para prevenir las enfermedades de las plantas. En ese mismo tenor, Pastrana *et al.* (2016), mencionan que métodos de control biológico económicos y libres de efectos nocivos sobre la salud humana y de los animales están surgiendo como alternativas eficaces a los productos químicos. Además, la preocupación de investigadores y consumidores por los residuos de fungicidas, así como la resistencia de los patógenos a algunos pesticidas, incrementan la inquietud a encontrar métodos alternativos para el manejo de las enfermedades y protección de las plantas (Zamanizadeh *et al.*, 2011).

El control biológico ofrece una alternativa al uso de pesticidas sintéticos con las ventajas de una mayor aceptación pública y la reducción del impacto ambiental (Reino *et al.*, 2008). Así pues, el uso de agentes biocontroladores es mucho más seguro y presumiblemente menos contaminante del ambiente que los productos químicos (Merkuz y Getachew, 2012). El control biológico en sus inicios como alternativa para el control plagas, fue definido como la “acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir” (DeBach, 1997). Cook y Baker (1983), definen al control biológico como: “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades de un determinado patógeno o parásito en su estado activo o latente, por la acción de uno o más organismos diferentes al hombre, en forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedante o antagonista, o por la incorporación de una población de uno o más antagonistas”, señalando que las actividades determinantes de enfermedades involucran crecimiento, infectividad, virulencia, agresividad, sobrevivencia y otras características del patógeno, o procesos que determinan infección, desarrollo de síntomas y reproducción. Gurr y Wratten (2000), señalan que la finalidad del biocontrol es cambiar el equilibrio en poblaciones de organismos nocivos, normalmente mediante un incremento artificial importante en la población del enemigo natural para favorecer la producción agrícola. Sin embargo, esta definición ha ido cambiando a lo largo del tiempo y fue la

Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) quien definió el control biológico como la “utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos” (Guédez *et al.*, 2008). Por otra parte, los costos de producir agroquímicos han ido en aumento, por lo que grandes empresas químicas están incursionando en el mercado de los biopesticidas, el cual se está expandiendo rápidamente y se estima para los próximos 10 años un aumento de 150 a 300% (Donoso, 2013).

Otro aspecto a considerar es que la eliminación progresiva de la mayoría de los fumigantes químicos utilizados para la desinfección del suelo, ha aumentado la demanda de alternativas no químicas que son eficaces en el control de enfermedades de las plantas causadas por hongos patógenos transmitidos por el suelo (Pastrana *et al.*, 2016). Así pues, se tiene que el control biológico, utilizando microorganismos antagonistas, se ha vuelto más importante en los últimos años por ser sostenible, seguro y respetuoso del medio ambiente (Dwi *et al.*, 2010). Al respecto, Yezli *et al.* (2015), sostienen que el uso de antagonistas biológicos es una técnica prometedora para la protección de plantas sin tener un efecto fatal sobre el medio ambiente.

Diversas investigaciones señalan que los microorganismos de la rizósfera pueden actuar como antagonistas naturales de una amplia gama de patógenos de plantas (Elshafie *et al.*, 2013). Debido a que la rizósfera ofrece la primera línea de defensa contra el ataque de patógenos, se considera que los microorganismos que crecen ahí son excelentes para usarse en programas de control biológico, pues el amplio espectro de actividad antagónica de varios microorganismos contra patógenos de plantas hace que estas especies sean buenos candidatos (Podile y Prakash, 1996; Zaccardelli *et al.*, 2013).

Diversos trabajos se han establecido en diferentes partes del mundo, en los cuales, mediante el uso de microorganismos antagonistas, como bacterias y hongos, se han empleado para el control de la fusariosis vascular o rabia (también llamada “secadera”) del garbanzo, tanto en condiciones experimentales como semi comerciales; dentro de los microorganismos más empleados se encuentran a

*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma*, considerando su diversidad de mecanismos de acción (Carrillo, 2011; Carrillo *et al.*, 2012). Al respecto, Cawoy *et al.* (2011), y Naher *et al.* (2014), señalan que los agentes de control biológico de los géneros de *Trichoderma* y *Bacillus* se han utilizado ampliamente para el control de diversas enfermedades de las plantas.

Ambos antagonistas, hongos y bacterias, constituyen la mayoría de la población microbiana en el suelo, el cual ha sido el principal reservorio natural, donde el equilibrio entre la diversidad de microorganismos es dinámico, contribuyendo en la reducción de enfermedades en plantas cultivadas y no cultivadas (Gajera y Vakharia, 2010; Singh y Islam, 2010). Según Filippi *et al.* (2012), los agentes biológicos producen señales químicas que provocan las rutas metabólicas implicadas en la acumulación de biomasa y la supresión de la enfermedad, así como el aumento de la productividad a través de antagonismos ecológicos directos e indirectos. El modo de acción de estos organismos antagonistas incluye micoparasitismo, la producción de antibióticos y metabolitos secundarios, la competencia por espacio y nutrientes, y la inducción de las respuestas de defensa incluyendo resistencia sistémica en la planta (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Compant *et al.*, 2005). Además, son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas y aumentar los rendimientos de los cultivos (Sturz *et al.*, 2000; Welbaum *et al.*, 2004; Harman, 2006).

Cabe señalar que en el biocontrol, se pueden utilizar poblaciones residentes o se puede introducir un antagonista. Así, las prácticas culturales pueden acompañar al biocontrol, con el objetivo de lograr un ambiente favorable para los antagonistas y la planta hospedante (Cook, 1985). Al respecto, es imprescindible indicar que a nivel mundial, diversas investigaciones se orientan hacia la búsqueda de microorganismos antagonistas nativos de cada región para el control de las enfermedades de diversos cultivos, pues se han reportado que ciertas cepas comerciales no se han adaptado a las condiciones ambientales donde se han aplicado (Calvo *et al.*, 2012), y en ocasiones se ha generado competencia o inhibición contra los organismos nativos (Robinson *et al.*, 2009).

### **1.3.6. Mecanismos de acción de control biológico de hongos y bacterias rizosféricos**

Hay diferentes mecanismos de acción, por medio de los cuales los microorganismos antagonistas afectan a los fitopatógenos que producen enfermedades en las plantas, mencionándose entre ellos a: antibiosis, competencia por espacio y nutrientes, parasitismo, síntesis de metabolitos como sideróforos, desactivación de enzimas de los patógenos, aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, estimulación del crecimiento vegetal e inducción de mecanismos de resistencia en la planta (Goldman *et al.*, 1994; Benhamou *et al.*, 1997; Punja, 1997; Harman, 2006; Martínez *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008b; Infante *et al.*, 2009; Shoresh *et al.*, 2010; Tchameni *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Acebo *et al.*, 2012; Ghirardi *et al.*, 2012).

Estos mecanismos de acción dependen de la producción de sustancias inhibitorias de los diferentes aislamientos del antagonista, de la interacción planta-patógeno-antagonista y de las condiciones ambientales que prevalezcan en el agroecosistema (Páez y Sanabria, 2007). Además, no son recíprocamente excluyentes, y aunque alguno de ellos puede actuar como mecanismo principal, también pueden funcionar en conjunto (Howell, 2003; Camelo *et al.*, 2011).

La multiplicidad de estos en un aislamiento es una característica importante para su selección como agente de control biológico (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008; Ajitha y Lakshmedevi, 2010). Asimismo, es imprescindible la selección de aislamientos promisorios para el control de un fitopatógeno, mediante el estudio y determinación de los mecanismos relacionados con dicho control (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

#### **1.3.6.1. Antibiosis**

Se refiere a la producción, por parte de un microorganismo, de sustancias tóxicas que inhiben o destruyen estructuras de la pared celular o atacan diferentes mecanismos celulares importantes en los organismos sensibles (Toure *et al.*, 2004).

Michel-Aceves *et al.* (2001), definen a la antibiosis como un proceso de interacción entre organismos, en el cual uno o más metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y tienen efecto dañino sobre uno o más organismos, normalmente actúan en bajas concentraciones. Además, los antibióticos y otros productos tóxicos que son volátiles (como el cianuro de hidrógeno), son capaces de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos fitopatógenos (Toure *et al.*, 2004).

En el caso de las bacterias antagonistas, estas producen antibióticos como las iturinas, bacilomicinas, micosubtilinas, visconinamida y tensinas (Stein, 2005; Babaloba, 2010), las cuales, disuelven o dañan polímeros estructurales de pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, tales como quitina y  $\beta$ -1-3-glucanos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994; Souto *et al.*, 2004). Otros compuestos antibióticos también detectados en diversas investigaciones son: pioluteorina, pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), ácido glucónico, derivados de la fenazina ramnolípidos, 2-hexil-5-propil resorcinol y lipopéptidos cíclicos (Kempf *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1998; Ligon *et al.*, 2000; Kaur *et al.*, 2006; Bardas *et al.*, 2009; Berry *et al.*, 2010; Fgaier y Eberl, 2010; Okubara *et al.*, 2010). Todas estas moléculas interrumpen la formación de la membrana plasmática, por la formación de pequeñas vesículas y por la liberación de electrolitos de alto peso molecular que degradan fosfolípidos (Stein, 2005). La sobreproducción de micosubtilina, tiene importantes propiedades antagonicas frente a *F. oxysporum* (Leclere *et al.*, 2005).

En el caso de antagonistas fúngicos como *Trichoderma*, la antibiosis se realiza por medio de la producción de metabolitos secundarios, entre ellos está un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Algunos de estos metabolitos secundarios, inhiben a otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas «antibióticos» (Dennis y Webster, 1971; Vinale *et al.*, 2008b; Rodríguez *et al.*, 2010). Se han identificado compuestos antibióticos producidos por *Trichoderma*, del tipo de las alquilpironas (6- $\alpha$ -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina),

poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides como viridina (Ghisalberti *et al.*, 1990; Demain y Fang, 2000; Vinale *et al.*, 2006; Ajitha y Lakshmidivi, 2010; Villamil *et al.*, 2012). Al respecto, Sivasithamparam y Ghisalberti (1998), informaron que *Trichoderma* produjo varios compuestos secundarios, incluidos los antibióticos antibacterianos y antifúngicos tales como policétidos, pyrones, y terpenos.

#### **1.2.6.2. Competencia**

Diversos reportes demuestran que en la actividad biocontrol, uno de los modos de acción más comunes es la competencia por nutrientes y espacio (Janisiewicz *et al.*, 2000; Chan y Tian, 2005; Droby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009). La competencia puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás, siendo un factor esencial para que exista competencia, la escasez o limitación de un requerimiento ya sea espacio y/o nutrientes (Hjeljord *et al.*, 1998; Infante *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2013). Asimismo, Cook y Baker (1983), sostienen que este mecanismo consiste en el uso de un requerimiento en común por dos especies, con la diferencia que uno de ellos hace mayor uso de este que el otro, limitando la cantidad de requerimiento disponible y generando un evento desigual. También, Droby *et al.* (2009), definen a la competencia como la demanda simultánea de los mismos recursos por dos o más poblaciones microbianas. Michel-Aceves *et al.* (2001), señalan que el mecanismo antagónico por competencia surge cuando al menos dos organismos requieren para su funcionamiento de un mismo alimento. El consumo de uno reduce la cantidad disponible del otro, al final se impone uno de ellos. Este modo de acción es común en bacterias y hongos, debido a la relación superficie/volumen que éstos tienen. Estas características les permiten asimilar los nutrientes disponibles y diluir las soluciones nutritivas con más rapidez y en mayor cantidad que los tubos germinativos de hongos patógenos filamentosos (Janisiewicz *et al.*, 2000).

La competencia más frecuente es por nutrimentos esenciales para el desarrollo de las funciones microbianas vitales: reproducción, nutrición, respiración y metabolismo, de esta manera se delimita la colonización de otras especies patógenas; mientras la competencia por espacio se presenta cuando el desarrollo de un microorganismo sobre determinada área, inhibe de cierto modo la invasión de otros (Cook y Baker, 1983). Ahora bien, la competencia por nutrientes y espacio dentro de su nicho ecológico se realiza en la superficie de la raíz (Michel-Aceves *et al.*, 2001); Do Carmo *et al.* (2011), señalan que este proceso se efectúa en la rizósfera, que es el área del suelo influenciada por los exudados de la raíz, que incluye el suelo unido a la raíz y que se extiende a pocos milímetros de la superficie del sistema radicular. Los exudados rizosféricos incluyen aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas (Albareda *et al.*, 2006). Los microorganismos rizosféricos compiten por estos metabolitos y por el sitio que ocupan sobre la raíz de la planta; siendo las uniones entre las células epidérmicas y el área donde emerge la raíz los sitios más poblados (Lugtenberg y Kamilova, 2009). La competencia por nutrientes es por lo general, por carbono, hierro y nitrato, y una cualidad que favorece la competencia del antagonista es la alta velocidad de crecimiento y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente (Sivan y Chet, 1989; Babaloba, 2010; Sunar *et al.*, 2013).

Cabe señalar que un agente de control biológico eficaz, es aquel con alta velocidad de crecimiento y capacidad de colonización y sobrevivencia en los tejidos de la planta, lo que le permite excluir al patógeno, mediante competencia por nutrientes importantes para la germinación de las esporas y el desarrollo de estructuras infectivas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

En la evaluación de la competencia bajo condiciones *in vitro* (cultivo dual), se ejerce principalmente por espacio y en ella intervienen la velocidad de crecimiento de las cepas del antagonista y factores externos como tipo de sustrato, pH y temperatura, entre otros (Harman, 2006; Reyes *et al.*, 2008). Bajo condiciones *in vivo*, la competencia se relaciona con la capacidad de colonización de la raíz y el espacio

adyacente. En ella influyen de forma importante factores como tipo de suelo, pH, temperatura y humedad (Reyes *et al.*, 2008). No obstante, la competencia en suelos o sustratos ricos en nutrientes por los que pudiera competir el patógeno, no es eficaz. Debido a esto, en aquellos suelos ricos en materia orgánica o con fertilización completa, este mecanismo tiene menos valor práctico (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

### **1.2.6.3. Parasitismo**

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos (Wilson *et al.*, 1994); consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista (Melgarejo *et al.*, 1989). El parasitismo es inducido por la producción de enzimas de degradación de la pared celular, como: celulasas, quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas por el organismo antagonista (Kaur *et al.*, 2006; Harman, 2006; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Estas enzimas se le conoce como enzimas líticas y son capaces de destruir la pared celular del hongo (Zhu, 2007).

Una clase parasitismo es el micoparasitismo, es decir, el parasitismo de un hongo por otro hongo (Infante *et al.*, 2009). El micoparasitismo consiste en el contacto directo entre dos organismos que tiene como resultante la muerte de uno de los componentes, seguida por la utilización de los nutrientes por parte del parásito (Lumsden, 1992). Por su parte, Melgarejo *et al.* (1989), y Lorito *et al.* (1990), definen al micoparasitismo como un antagonismo entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, quitinasas, glucanasas y celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. De acuerdo con Chet *et al.* (1998), el micoparasitismo es un mecanismo complejo que generalmente implica la producción de una enzima lítica de la pared celular. Es producto de la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas (Howell, 2003; Woo *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2008).

1. Crecimiento quimiotrófico. Donde el antagonista puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes (Sivan *et al.*, 1989).
2. Reconocimiento. Se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato (Vinale *et al.*, 2008a).
3. Adhesión y enrollamiento. Ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno, que mediante enrollamientos, ganchos y cuerpos de tipo apresorios la penetran por acción hidrolítica de las enzimas (Chet *et al.*, 1998; Bernal *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2013).
4. Actividad lítica. Es la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas, celulasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno (Küçük *et al.*, 2004; Martínez-Absalón *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013).

El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación (Nico *et al.*, 2005). Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Chet *et al.*, 1981; Bernal *et al.*, 2007; Vinale *et al.*, 2008a). Las enzimas desempeñan una función esencial en el micoparasitismo, entre las enzimas, se considera fundamental la  $\alpha$ -1,3 glucanasa, estrechamente relacionada con la degradación de la pared celular de patógenos (Sanz *et al.*, 2005; Djonović *et al.*, 2006; Larralde-Corona *et al.*, 2008; Martínez-Absalón *et al.*, 2012).

#### **1.2.6.4. Estimulación del crecimiento vegetal**

De acuerdo con Kloepper *et al.* (1980), hay microorganismos que habitan en la rizósfera y que presentan la propiedad de estimular el crecimiento, la producción y la salud vegetal, empleando una amplia variedad de mecanismos moleculares (Malik y Sindhu, 2011). Asimismo, Harman *et al.* (2004a), afirman que durante muchos años se ha sabido de la habilidad de algunos microorganismos para estimular el crecimiento de las plantas, en especial el sistema radicular; sin embargo, aún no se conocen con certeza los mecanismos involucrados. Las sustancias que promueven

el crecimiento vegetal son producidas por ciertos microorganismos rizosféricos y pueden influir directa o indirectamente sobre el metabolismo y fisiología de la planta (Saleem *et al.*, 2007; Bhattacharyya, 2012).

La estimulación del crecimiento vegetal es una serie de mecanismos por medio de los cuales los microorganismos puede influir positivamente en el crecimiento de la planta, e incluyen la síntesis y excreción de sustancias fitoestimuladoras, que pueden incluir diversos tipos de fitohormonas como las auxinas, citocininas, etileno, giberelinas, ácido abscísico, ácido indol-3-acético, compuestos orgánicos volátiles e incluso activando la producción *in planta* de compuestos que refuerzan la inmunidad vegetal como ácido jasmónico, ácido salicílico y fitoalexinas (Arkhipova *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Ambreen y Shahida, 2010; Vilchez y Manzaner, 2011). Estas moléculas exhiben diferentes efectos específicos sobre la fisiología vegetal, como incrementar el volumen y desarrollo radicular, aumentar la tasa de respiración de la raíz de la planta hospedera y el flujo de protones en la membrana de la raíz, en consecuencia se aumenta la absorción de nutrientes y minerales solubles (Ortíz-Castro *et al.*, 2009; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). También diversas investigaciones indican que estas moléculas incrementan la formación de hojas, germinación de semilla, elongación del tallo, floración y desarrollo del fruto (Babaloba, 2010; Camelo *et al.*, 2011; Bal *et al.*, 2012; Vacheron *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2014). Asimismo, multiple trabajos señalan que la estimulación del crecimiento en planta, por ciertos microorganismos rizosféricos, es debido a la fijación del nitrógeno atmosférico y solubilización del fósforo, incluyendo a bacterias del género de *Bacillus* y *Pseudomonas* (Rodríguez *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2012).

De la misma manera, la producción de sideróforos se considera como uno de los mecanismos para estimular el crecimiento vegetal, pues está ampliamente documentada la participación del hierro en diferentes procesos biológicos vitales para las células como cofactor de una gran variedad de reacciones enzimáticas, por lo que la limitación de este macronutriente es letal para los microorganismos (Tenorio *et al.*, 2012); y ciertas cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen la capacidad de

producirlos (Carson *et al.*, 2000; Madigan y Martinko, 2005; Dehner *et al.*, 2010; Tenorio *et al.*, 2012; Sunar *et al.*, 2013).

En ese mismo tenor, cepas de *Trichoderma* mejoran la solubilidad de los nutrientes del suelo (Harman *et al.*, 2004b; Scervino *et al.*, 2010; Charana y Yoon, 2013; Karunai, 2013). Por su parte, Altamore *et al.* (1999), sugirieron que la promoción del desarrollo se debe a que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar manganeso, sin importar el pH del medio, ni la disponibilidad del mismo, es decir, que lo solubiliza constantemente, y como este microelemento es requerido para funciones fisiológicas de las plantas, como fotosíntesis, metabolismo del nitrógeno, síntesis de los compuestos aromáticos, y además, para precursores de aminoácidos y hormonas, de fenoles y de lignina, se asegura en parte, el incremento de crecimiento en las plantas.

#### **1.2.6.5. Resistencia sistémica inducida**

La interacción de algunos microorganismos rizosféricos con su planta hospedera puede reducir el número de enfermedades de la planta o la severidad de la sintomatología de la infección generada por algunas bacterias, hongos y virus patógenos (Poupin *et al.*, 2013). Esto ocurre porque algunas de las rizobacterias y hongos rizosféricos desencadenan en las plantas un proceso de capacidad defensiva o inmunidad por periodos prolongados, conocido como resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en Inglés) (Lucas *et al.*, 2013). La ISR induce la resistencia de tejidos sistémicos al ataque por fitopatógenos mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles, de ácido jasmónico, de ácido salicílico y del etileno que participan en la protección de las plantas a diferentes enfermedades (Kloepper *et al.*, 1993; Glick, 1995; Shah, 2009). Campell (1989), sostiene que las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra los patógenos en el transcurso del tiempo y proceso evolutivo. Por tal motivo, las plantas presentan mecanismos bioquímicos, físicos y estructurales de resistencia, los cuales están relacionados con la capacidad de éstas para inhibir el desarrollo de una enfermedad ocasionada por fitopatógenos, la resistencia inducida es un tipo particular de este fenómeno, en la cual, los mecanismos de defensa reconocen y responden a la amenaza dada por la llegada

del patógeno (Campell, 1989), y algunos de estos mecanismos son activados por la presencia de microorganismos antagonistas (Poupin *et al.*, 2013).

La respuesta ISR comparte muchas propiedades con la respuesta inmune innata, este proceso depende de la señalización del ácido jasmónico y etileno en la planta (Lucas *et al.*, 2013). La acumulación de estas moléculas coordinan a nivel sistémico la activación y el mejoramiento de la capacidad de defensa (Bordiec *et al.*, 2011); mediante mecanismos como: el reforzamiento de la pared celular, la producción de fitoalexinas anti-microbianas, peroxidasa, quitinasa,  $\beta$ 1-3 glucanasa, fenilalanina amonio liasa, proteínas relacionadas con la patogénesis y producción de biosurfactantes (Sunar *et al.*, 2013). Asimismo, Bhattacharyya (2012), reporta que algunos organelos y moléculas bacterianas inducen la respuesta ISR, tales como: lipopolisacáridos (LPS), flagelo, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos cíclicos, el factor antifúngico PhI, molécula (AHLs) y los degradadores de compuestos volátiles producidos por *Bacillus subtilis* rompen la acetoina y 2,3-butaneidol. Otros ejemplos de rizobacterias capaces de promover el ISR en plantas son: *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. pumila*, *B. mycoide*, *Rhizobium leguminosarum* y *Pseudomonas*.

Dentro de los agentes de control reportados como efectivos en el mecanismo de inducción de resistencia sistémica se encuentran también varias especies del género *Trichoderma* para controlar fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004b; Howell, 2006). Asimismo, Benítez *et al.* (2004), y Vinale *et al.* (2008b), reportan que la presencia de *Trichoderma* estimula la inducción de la respuesta hipersensible, resistencia sistémica adquirida (SAR), y la resistencia sistémica inducida (ISR) en las plantas. Algunas especies de *Trichoderma* pueden activar el mecanismo nativo de defensa en las plantas, conocido como inducción de resistencia sistémica, esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista (Shoreh *et al.*, 2010; Sharon *et al.*, 2011).

Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizósfera y estar relacionados con la IRS en las plantas. La primera clase son proteínas con actividad enzimática o de otro tipo. Algunas de las proteínas secretadas por *Trichoderma* al parecer inducen solo respuestas locales y necrosis

(Martínez *et al.*, 2001; Brotman *et al.*, 2008), otras activan mecanismos de defensa en plantas como los productos de los genes de avirulencia (Woo *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2007).

La inducción de resistencia sistémica por *Trichoderma* involucra cambios celulares en el hospedero, tales como un aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y aumento en la actividad peroxidasa y quitinasa (Yedidia *et al.*, 1999). Otros procesos relacionados con la inducción sistémica contra patógenos del suelo, como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, son el confinamiento, la inhibición del patógeno y los cambios histológicos en el hospedero (Benhamou *et al.*, 1998; Yedidia *et al.*, 1999). Estos últimos relacionados con la producción de reguladores de crecimiento y estimulación de la división, diferenciación y crecimiento celular en la planta por el agente elicitor (De Cal *et al.*, 2000). Aún no se aclaran y amplían los conocimientos acerca de *Trichoderma* como inductor de resistencia, pero es indiscutible su función en la defensa de las plantas (Naher *et al.*, 2014).

### **1.2.7. Bacterias rizosféricas: *Bacillus* y *Pseudomonas***

Las raíces de las plantas proporcionan un óptimo ambiente microbiano. Las raíces se desarrollan en un medio cuya humedad es generalmente poco variable y las concentraciones de nutrientes son altas, por lo que constituyen un entorno ideal para la acción microbiana (Rives *et al.*, 2007; Perez y Chamorro, 2013). Los exudados radicales, formados por azúcares, mucigel, ácidos orgánicos y aminoácidos, pueden cambiar la composición del suelo en la vecindad de la raíz, creando un medio selectivo para la existencia de grandes poblaciones microbianas heterótrofas, que establecen diferentes interacciones con la planta, tanto positivas (promotoras del crecimiento vegetal) como negativas (patogénicas) (Whipps, 2001).

Las poblaciones de microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos (Matiru *et al.*, 2004). Dentro de estos grupos, se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Kloepper *et al.*, 2004).

Como describieron Kloepper *et al.* (1999), así como Gray y Smith (2005), las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden también penetrar en las raíces y establecerse como poblaciones endófitas. Muchas de ellas tienen la capacidad de trascender las barreras de la endodermis, atravesar la corteza de la raíz hasta el sistema vascular y, como consecuencia, vivir como endófitos en tallos, hojas, tubérculos y otros órganos, sin causar perjuicio a la planta (Compant *et al.*, 2005; Perez y Chamorro, 2013). Además estas bacterias son conocidas por su potencial benéfico como biocontroladores de organismos del suelo que causan enfermedades en las plantas (Kloepper *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2014).

En términos de agricultura ecológicamente sustentable, las bacterias rizosféricas también constituyen una excelente estrategia para reducir los residuos tóxicos en el medio ambiente, resultantes del uso indiscriminado de pesticidas (García *et al.*, 2015). El uso de microorganismos nativos, como las bacterias rizosféricas, podría ser parte de una solución efectiva en la disminución del uso de agroquímicos y recuperación de la fertilidad de los suelos agrícolas (Arcos y Zúñiga, 2016). De acuerdo con Berg (2009), las bacterias rizosféricas, mejor conocidas como rizobacterias, son bacterias que habitan en la rizósfera o rizoplano; las cuales se asocian de manera natural a las raíces de las plantas de una forma más o menos íntima; facilitan de manera directa o indirecta la disponibilidad de determinados nutrientes para las plantas, tales como nitrógeno, fósforo e hierro (Fulchieri y Frioni, 1994; García *et al.*, 1995).

Las rizobacterias pueden tener mecanismos de acción directa o indirecta. Los mecanismos directos ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta (Gutiérrez-Manero *et al.*, 2001; Patten y Glick, 2002; Huang *et al.*, 2012), tienen acción similar a las fitohormonas aplicadas a las semillas y plantas, con una mayor proliferación de pelos radiculares, que incrementan y mejoran la eficiencia de absorción mineral de nitrógeno, fósforo e hierro (García *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 2009; Arcos y Zúñiga, 2016). Los mecanismos indirectos ocurren cuando los metabolitos producidos por las bacterias rizosféricas pueden

funcionar como antagonistas, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de fitopatógenos, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia (Bashan, 1998; Gutierrez-Manero *et al.*, 2001; Santoyo, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Nandhini *et al.*, 2012).

Berg (2009), señala que estos mecanismos incluyen: Producción de hormonas de las plantas, entre ellas, la auxina; solubilización de fosfato y la producción de quelatantes de hierro, como sideróforos; liberación de metabolitos antimicrobianos; degradación de la pared celular por patógenos por la producción de enzimas líticas; competencia por los nutrientes; inducción de resistencia sistémica en plantas. Se ha demostrado que una gran gama de bacterias rizosféricas influyen positivamente en el crecimiento de las plantas a través de la síntesis de ciertas sustancias reguladoras del crecimiento, como giberelinas, citoquininas y auxinas, que estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales aumentando la cantidad de raíces en las plantas (Yasar *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2013); otras además están involucradas en procesos de solubilización de fósforo. Adicionalmente, estas bacterias son eficientes en el control de patógenos al producir metabolitos secundarios que funcionan como antagonistas de microorganismos perjudiciales; por ello también se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Sivamani y Gnanamanickam, 1988; Naik *et al.*, 2008; Jha *et al.*, 2009).

Diversas investigaciones señalan que estas rizobacterias colonizadoras de la rizósfera, inoculadas a las semillas, promueven el crecimiento vegetal, traducándose muchas veces, en incrementos de rendimientos de las cosechas; pueden actuar como fertilizadoras del suelo gracias a su capacidad para movilizar nutrientes (Zhoinska *et al.*, 1992; Malviya *et al.*, 2012), así como producción de fitohormonas que modifican la fisiología de las plantas, permitiendo optimizar los procesos de floración, germinación y establecimiento de la plántula (Schippers *et al.*, 1995; Probanza *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Eshetu *et al.*, 2015).

Dentro del grupo de bacterias rizosféricas, se encuentran las bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* (Reis *et al.*, 2000). El género *Bacillus* incluye más de 100

especies, son bacterias Gram positivas, aeróbicas (facultativamente anaeróbicas), formadoras de esporas. La esporulación proporciona un mecanismo de resistencia a los cambios ambientales, que se traducen en un aspecto importante para la producción de inoculantes (Tejera *et al.*, 2012). Su seguridad y su capacidad de producir compuestos beneficiosos para el propósito agronómico hace de *Bacillus* una de las bacterias más estudiadas (Earl *et al.*, 2008). Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacterias Gram-negativas, de forma recta o ligeramente curvada, saprofitas, pertenecientes a la rama de las proteobacterias, mismas a la que pertenecen las enterobacterias; este género está compuesto por más de 100 especies (Costerton, 1980; Hardalo y Edberg, 1997; Madigan y Martinko, 2005; Lalucat y Garcia-Valdes, 2010).

De acuerdo con diversos investigadores, las bacterias del género *Bacillus*, son capaces de producir sustancias fisiológica y bioquímicamente activas, como vitaminas, giberelinas, citoquininas y ácido indolacético en cantidades significativas, las cuales mediante su acción conjunta estimulan la germinación de las semillas, aceleran el desarrollo de las plantas e incrementan el rendimiento de los cultivos (Lazarovits y Nowak, 1997; Islam *et al.*, 2012), sobre todo en condiciones de estrés (Torres-Rubio *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2014).

Asimismo, diversos estudios señalan que bacterias del género de *Pseudomonas* pueden ejercer un efecto benéfico directo en las plantas a través de la síntesis de fitohormonas y de vitaminas, estimulación de la germinación de semillas y emergencia de plántulas, inhibición de la síntesis de etileno y solubilización de fósforo inorgánico (Siddiqui y Shaukat, 2003; Rosas *et al.*, 2009; Fgaier *et al.*, 2010). Al respecto, Showkat *et al.* (2012), sostienen que *Pseudomonas* produce metabolitos como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas.

Varios estudios han empleado estos géneros bacterianos como promotores del crecimiento de las plantas, en particular *Bacillus subtilis* (Lugtenberg y Kamilora, 2009). Verma *et al.* (2009), al co-inocular con diversas rizobacterias promotoras de crecimiento, semillas de garbanzo, incluyendo cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, reportaron un incremento significativo en el peso seco de raíz y parte aérea de la

planta, así como en el número de granos. Arcos y Zúñiga (2016), evaluaron bajo condiciones de campo, cepas nativas de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, incluyendo a cepas de *Bacillus*, entre ellas la especie *subtilis*, reportando incrementos en la altura de planta, contenido de materia seca y el rendimiento total de papa, en las parcelas inoculadas con las cepas en comparación al control no inoculado, mediante algunos mecanismos de promoción del crecimiento, tales como: fijación biológica del nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfatos y la síntesis de fitohormonas como el ácido indolacético. También se ha reportado que bacterias como *Bacillus megatherium* son solubilizadoras del fósforo del suelo, capaces de sustituir hasta 70% del fertilizante fosfórico, poniendo a disposición de las plantas el fósforo almacenado y fijado en el suelo (Omay *et al.*, 1993). León *et al.* (2009), realizaron ensayos de colonización de raíces de soja, encontrando que cepas de *Pseudomonas* y de *Bacillus* incrementaron su tasa de emergencia.

Por otra parte, en la mayoría de los casos, bacterias promotoras del crecimiento que han resultado efectivos agentes de biocontrol de enfermedades fungosas, incluyendo al patógeno *Fusarium oxysporum*, comprenden a los géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales además han sido reportadas como organismos inductores de resistencia sistémica en las plantas (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Kloepper *et al.*, 2004). En investigación realizada por Karimi *et al.* (2012), reportan un efecto biocontrolador de cepas nativas de *Bacillus* y *Pseudomonas* contra la fusariosis vascular del garbanzo. En ese mismo tenor, Kloepper *et al.* (2004), documentaron que cepas de *Bacillus* provocaron reducciones significativas en la incidencia y severidad de varias enfermedades en diversos hospedantes tanto en pruebas de invernadero como en ensayos a campo abierto, las cuales están asociadas con cambios estructurales y alteraciones citoquímicas en las plantas durante el ataque de patógenos.

Diferentes bacterias, incluyendo *Bacillus* se ha utilizado para controlar patógenos de las plantas (Sansinenea y Ortiz, 2011). Las bacterias del género *Bacillus* son de gran importancia como biocontroladores de diversos fitopatógenos, debido a su tolerancia extrema al calor y la desecación y por su potencial para producir una amplia gama de

metabolitos con actividad biológica como antibióticos, antimicrobianos, antivirales, toxinas, hidrolasas y lipopéptidos así como actividades que permiten a la bacteria seguir con vida en el medio ambiente (Katz y Demain, 1977; Handelsman *et al.*, 1990; Sansinenea y Ortiz, 2011; Lamsal *et al.*, 2012). Al respecto, Lima *et al.* (2014), afirman que el control biológico de enfermedades de las plantas por agentes procariotas como *Bacillus* se puede explicar, al menos en parte por la producción de enzimas; estas bacterias tienen la capacidad de controlar patógenos de plantas a través de la producción de metabolitos inhibitorios y una gran variedad de antibióticos de manera específica, así como la inducción de la resistencia de la planta a los patógenos (Shu-Mei, 2012; Lee y Kim, 2016).

En un estudio *in vitro*, realizado por Baysal *et al.* (2013), utilizando cepas de *Bacillus* para investigar su efecto inhibitorio sobre el hongo *Fusarium*, reportaron que este era debido a la producción de enzimas líticas, celulasas, proteasas, 1,4- $\beta$ -glucanasa e hidrolasas por parte de la bacteria. Asimismo, Prashar *et al.* (2013), en un experimento *in vitro*, demostraron que cepas de *Bacillus* sp. exhibieron actividad antagónica contra cepas de *Fusarium oxysporum* extraídas de la rizósfera de plantas de tomate. Por su parte, Ríos-Velasco *et al.* (2016), reportan que al emplear dos cepas nativas de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*, estas inhibieron su crecimiento micelial en un promedio de 46.8%. En experimento *in vitro* realizado por Pastrana *et al.* (2016), se observó, inhibición del crecimiento de colonias de *M. phaseolina* y *Fusarium solani* de un 43 y 37%, respectivamente por *Bacillus* spp. Asimismo, Nascimento *et al.* (2016), reportan que ocho cepas antagonistas de *Bacillus*, inhibieron el crecimiento micelial del hongo *Magnaporthe oryzae* que provoca la enfermedad de tizón en arroz. Ahora bien, Correa *et al.* (2009), Madhaiyan *et al.* (2010), y Zhang *et al.* (2012), encontraron una alta capacidad de algunas cepas de *Bacillus* para inhibir *in vitro*, el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos; señalando que esto pudo deberse a la producción de compuestos orgánicos volátiles como cianuro de hidrógeno, así como por la producción de antibióticos pertenecientes a la familia de las iturinas y subtilinas, que actúan en la pared celular de los hongos; esta inhibición también es causada por la producción de

enzimas hidrofílicas que destruyen los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, los cuales son usados como una fuente de energía.

Con respecto a *Bacillus subtilis*, diversos autores señalan que estas producen un amplio espectro de sustancias bioactivas con un gran potencial para la biotecnología, tales como: lipopéptidos de surfactina, fengicina, y los compuestos iturina incluyendo iturina A, B, y C, micosubtilina, y bacilomicina, que son biosurfactantes y peptídicos antibióticos con potente actividad antimicrobiana (Bland, 1996; Bent y Yu, 1999; Bacon y Hinton, 2002; Bacon *et al.*, 2004). Asimismo, Mendoza *et al.* (1995), y Liu *et al.* (2006), sostienen que *Bacillus subtilis* posee muchas características como un excelente agente biocontrolador, pues produce el antibiótico conocido como iturina que tiene acción efectiva contra varios fitopatógenos.

Varias investigaciones realizadas tanto en laboratorio como en campo, indican que *B. subtilis* es uno de los agentes más eficaces en el control de *Fusarium oxysporum* (Baysal *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Alamri *et al.*, 2012). Igualmente, estudios *in vitro* realizados por Abdulkareem *et al.* (2014), demuestran que *Bacillus subtilis* tiene actividad antagonistas contra *Fusarium* ya que redujo en más del 50% su crecimiento micelial. Mientras que, Yezli *et al.* (2015), al emplear cepas de *Bacillus subtilis* en confrontación con cepas de *Fusarium oxysporum*, reporta inhibición del crecimiento micelial del patógeno en rangos que oscilaron entre un 56 y 60%. Además, Chakraborty *et al.* (2009), reportan que *Bacillus subtilis* causó deformidades estructurales en hongos patógenos en condiciones de cultivo *in vitro* debido a la producción de compuestos antifúngicos difusibles y volátiles. Por su parte, Huang *et al.* (2012), sostienen que *Bacillus subtilis* es inhibitoria de varios hongos patógenos y provoca la lisis extensa del micelio de fitopatógenos como *Aspergillus niger* y *Sclerotium rolfsii*. Cepas de *B. subtilis* producen un amplio espectro de péptidos bioactivos con un gran potencial para la biotecnológica, tales como: lipopéptidos de surfactina, fengicina, y los compuestos iturina incluyendo iturina A, B, y C, micosubtilina, y bacilomicina, que son biosurfactantes y peptídicos antibióticos con potente actividad antimicrobiana (Bland, 1996; Bent y Yu, 1999; Bacon y Hinton, 2002; Bacon *et al.*, 2004).

Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), mostraron que ciertas cepas de *Pseudomonas* ensayadas tiene una acción aceptable contra *Fusarium oxysporum*. El grado de eficacia de metabolitos puede variar de acuerdo con la naturaleza, la calidad, la cantidad de antibióticos secretados por los antagonistas (Fekadu y Tesfaye, 2013). En diversos trabajos se ha informado de la efectividad de cepas de *Pseudomonas* en el control de hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces*, *Aspergillus* y *Pyricularia*, entre otros (Nour y El-Ghiet, 2011; Showkat *et al.*, 2012; Marchi *et al.*, 2013).

Con respecto a las propiedades protectoras de *Bacillus* para gestionar varias enfermedades en campo, tanto de la raíz como foliares, se menciona que estas son relacionadas con su capacidad de producir péptidos antibióticos (Kloepper *et al.*, 1996). En ese contexto, Arcos y Zúñiga (2015), al evaluar bajo condiciones de campo, cepas nativas de *Bacillus* por su capacidad para controlar fitopatógenos en el cultivo de papa, reportaron que en las parcelas donde se empleó el inóculo de las cepas antagonistas, se presentó un 60% menos de tubérculos infectados con *Rhizoctonia solani* y *Spongospora subterranea*, en comparación con la parcela control. Jimtha John *et al.* (2016), encontraron en su estudio que los aislados de *Bacillus* tienen una notable actividad antagonista contra *Pythium myriotylum* e inhibieron la germinación de conidios, además presentaron propiedades de promoción de crecimiento en plantas de jengibre. De la misma manera, al probar en campo, cepas nativas de *Bacillus subtilis* como inóculo en semillas de garbanzo, Moradi *et al.* (2012), reportaron que los aislamientos lograron proteger significativamente a las plantas de la infección causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Hassan *et al.* (2014), evaluando cepas nativas de *B. subtilis* para el control de *F. oxyporum*, causante de la pudrición de raíz de Jamaica, reportaron que estas cepas inhibieron el crecimiento micelial del patógeno en un promedio de 77%. Además, cepas de *Bacillus megaterium* han demostrado que ejercen un efecto biocontrol sobre *Fusarium* spp. en varios cultivos (Santoyo, 2012).

Por otra parte, con el objetivo de aislar y seleccionar cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* capaces de desarrollar múltiples mecanismos de control de hongos

patógenos del cultivo de soja, León *et al.* (2009), realizaron pruebas de antagonismo y detección de productos antifúngicos *in vitro*, encontrando que, una cepa de *Pseudomonas* y una de *Bacillus*, protegieron a las plantas de soja contra el damping-off ocasionado por *Pythium ultimum*. En ensayos realizados *in situ*, aislados de *Pseudomonas* demostraron ser eficientes en el control de fusariosis en tomate, ya que la aplicación de estos aislados provocaron reducción significativa de la incidencia de la marchitez y severidad de la enfermedad en las plantas, con un aumento en el rendimiento (Srivastavaa *et al.*, 2010). Del mismo modo, Adhilakshmi *et al.* (2008), reportan que la aplicación de cepas nativas de *Pseudomonas* redujeron significativamente la incidencia de la pudrición de la alfalfa causada por *Fusarium oxysporum*. En un estudio realizado por Manjunatha *et al.* (2013), que involucró la evaluación de aislados nativos *Pseudomonas fluorescens* como agentes biocontrol de la podredumbre de la raíz seca de garbanzo, se reporta que estos aislados se pueden utilizar en condiciones de campo para el control de la enfermedad ya que ésta disminuyó significativamente. Aislamientos nativos de *Pseudomonas* han demostrado ser buenos agentes de biocontrol, capaces de proteger a las plantas de la infección, causadas por diferentes agentes fitopatógenos por medio de síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por la inducción de la resistencia sistémica (Siddiqui y Shaukat, 2003; Alves *et al.*, 2004; Fgaier *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2009).

#### **1.2.8. El hongo rizosférico *Trichoderma***

El potencial de hongos rizosféricos como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos del suelo, así como organismos promotores del crecimiento de plantas, ha sido demostrado en varias investigaciones (Mukherjee *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009; Radheshyam *et al.*, 2012; Naher *et al.*, 2014). El agente de control biológico, *Trichoderma*, es uno de los más estudiados a nivel mundial por sus mecanismos de acción, sobre patógenos de plantas y su interacción con otros microorganismos de su entorno, reportándose múltiples trabajos de antagonismo con esta especie de hongo cosmopolita en diversos países (Howell, 2003; Suárez y Cabrales, 2008; Druzhinina *et al.*, 2011; Merchán-Gaitán *et al.*, 2014). Este antagonista ha sido

ampliamente investigado por su capacidad en proteger las plantas y controlar patógenos en diferentes condiciones del suelo, por producir numerosos compuestos biológicamente activos, lo que ha propiciado su comercialización como biofertilizante y bioplaguicida (Vinale *et al.*, 2008a). Naher *et al.* (2014), mencionan que *Trichoderma* es uno de los agentes de biocontrol más versátiles que durante mucho tiempo se ha utilizado para el manejo de hongos patógenos de plantas.

*Trichoderma*, es un género de hongos que se encuentran en los suelos de todas las zonas climáticas del mundo y son importantes descomponedores de materiales leñosos y herbáceos; 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 (Vinale *et al.*, 2008a; Hoyos *et al.*, 2009). Zivkovic *et al.* (2010), reportan que el género *Trichoderma* esta biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos, así como en condiciones adversas, sobreviviendo en forma de clamidosporas, dándole a este hongo una importante ventaja en la competencia por espacio y nutrientes ante los fitopatógenos. Hjeljord *et al.* (2000), mencionan que este hongo tiene un rápido crecimiento fúngico, así como conidios persistentes y un amplio espectro de utilización de sustrato, siendo muy eficiente en la competición por nutrientes y por espacio.

Además, *Trichoderma*, es un hongo anaeróbicos típico, facultativo y cosmopolita, que se pueden encontrar en grandes cantidades en los suelos agrícolas y en otros sustratos tales como madera en descomposición (Irina y Christian, 2004). Pertenecen a la subdivisión de *Deuteromycetes*, cuyos miembros no tienen o no exhiben un estado sexual determinado, la mayoría de las cepas, están adaptadas a un ciclo de vida asexual (Harman *et al.*, 2004a). Asimismo, *Trichoderma* es señalado como un hongo oportunista, avirulento y simbiote de las plantas, que actúa como antagonista y parasitaria contra los hongos patógenos de diversos cultivos, demostrándose en numerosos estudios que es un agente de biocontrol eficaz para el manejo de enfermedades de las plantas, además, varios productos comerciales de *Trichoderma* están disponibles como biofumigantes, bioplaguicidas o enmiendas del suelo o como potenciadores de crecimiento de las plantas (Papavizas, 1985; Chet, 1987; Harman *et al.*, 2004a; Vinale *et al.*, 2008a). De acuerdo con Benítez *et al.*

(2004), *Trichoderma* tiene una resistencia natural a muchos de los compuestos tóxicos, incluyendo herbicidas, fungicidas, y compuestos fenólicos, por lo tanto, pueden crecer rápidamente e impactar sobre los patógenos mediante la producción de compuestos metabólicos que impiden germinación de las esporas (fungistasis), matar las células (antibiosis), o modificar la rizósfera (por ejemplo, acidificando el suelo de modo que los agentes patógenos no pueden crecer). Ahora bien, Landa *et al.* (2004a), señalan que *Trichoderma* se puede utilizar como un componente en la opción del manejo integrado de las enfermedades para minimizar los impactos económicos de su control.

Harman (2006), menciona que entre los efectos positivos de la inoculación de plantas con *Trichoderma*, se incluyen: control biológico de enfermedades causadas por patógenos en la raíz y en algunos foliares; inducción de resistencia sistémica en las plantas; cambios en la composición de la microflora de las raíces; mejora la absorción de nutrientes, incluyendo, pero no limitado, al nitrógeno; mejora la solubilidad de los nutrientes del suelo; mayor desarrollo de las raíces y aumento de la formación de pelos radiculares. El hongo *Trichoderma* es uno de los microorganismos más utilizados como biocontrolador de fitopatógenos, el cual muestra una amplia gama de hospedantes y dentro de ellos están los hongos fitopatógenos de importancia, tales como: *Fusarium oxysporum ciceris*, *Fusarium oxysporum cubense*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinérea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia*, *Peronospora*, *Pythium* y *Phytophthora*, entre otros (Ezziyiani *et al.*, 2004; Gorgen *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Tchameni *et al.*, 2011; Acebo *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013; Suárez y Alba, 2013). Asimismo, Joshi *et al.* (2010, y Singh *et al.* (2010), señalan que este género ha sido utilizado por su eficacia en el control biológico de enfermedades del sistema radicular, entre las que destacan hongos fitopatógenos como: *Alternaria*, *Colletotrichum* y *Verticillium*. Varias especies del género *Trichoderma* pueden actuar a través de la combinación de diferentes mecanismos de acción como competencia, micoparasitismo, antibiosis e inducción de resistencia a la planta, incrementando la respuesta de crecimiento y tolerancia al estrés (Infante *et al.*, 2009). Benítez *et al.* (2004), sostienen que la inanición es la causa más común de muerte para los microorganismos, así que la

competencia por los nutrientes es especialmente importante en el control biológico de fitopatógenos. La absorción de hierro es esencial para los hongos filamentosos y *Trichoderma* puede causar la inanición por hierro, ya que excreta moléculas de bajo peso específico, las cuales quelatan al hierro férrico, denominados sideróforos (Ruano y López, 2009). *Trichoderma* produce sideróforos altamente eficientes que detienen el crecimiento de otros hongos (Woo *et al.*, 2006; Tchameni *et al.*, 2011). Infante *et al.* (2009), indican que cuando existe competencia por estos recursos, la velocidad de crecimiento y esporulación de un aislamiento puede ser un indicador de la capacidad de colonización efectiva en el nicho ecológico al que pertenece el hongo. Por tanto, la eficiencia de *Trichoderma* para inhibir hongos fitopatógenos puede deberse, en parte, a su competencia por espacio y nutrientes, así como por los otros mecanismos antagónicos ejercidos por esta especie (Ezziyyani *et al.*, 2004).

De acuerdo a Zivkovic *et al.* (2010), este género también es conocido por producir antibióticos que inhiben a diversos fitopatógenos. El efecto de antibiosis de *Trichoderma* es por la producción de sustancias como la tricodermina, tricodermol, tricotoxina, harzianum A, harzianolido y richotoxina (Vinale *et al.*, 2006; Ruano y López, 2009; López *et al.*, 2011). *Trichoderma* produce numerosos antibióticos como son: suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos, trichorzianina, gliotoxina viridina y gliovirin (Gary y Kubicek, 2005; Infante *et al.*, 2009; Vinale *et al.*, 2008a; Martínez *et al.*, 2013). Por su parte, Cooney *et al.* (2001), mencionan que *Trichoderma* produce el antibiótico 6-pentil- $\alpha$ -pirone, el cual tiene un efecto dual en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* y también puede regular los genes por la biosíntesis de tricotecenos y micotoxinas con actividad antimicrobiana de amplio espectro. De acuerdo con lo reportado por Infante *et al.* (2009), algunas especies de *Trichoderma* tienen altos niveles de potencial parasítico y actividad metabólica, que les permite confrontar eficientemente las estructuras fúngicas de los hongos. En este tenor, algunas cepas de *Trichoderma* han sido explotadas como agentes de control biológico de patógenos, incluyendo hongos y nematodos, debido a la producción de enzimas de degradación de la pared celular (Vinale *et al.*, 2008a).

El micoparasitismo de *Trichoderma* es debido a la producción y regulación de las enzimas líticas y de degradación tales como celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas (Kaur *et al.*, 2006; Harman, 2006; Mukherjee *et al.*, 2008). Además, Paredes-Escalante *et al.* (2011), reportaron otros metabolitos como lipasas y  $\beta$ -1-3-Glucanasa, producidos por *Trichoderma*, que también participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma*, que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno (López *et al.*, 2011). Durante el proceso de micoparasitismo, *Trichoderma* secreta enzimas que degradan la pared celular del otro hongo, además por la secreción de exoenzimas hidrolíticas disminuyen el crecimiento y la actividad del patógeno (Howell, 2006). Los hongos *Trichoderma* se adhieren con carbohidratos unidos a lecitinas en la pared celular del patógeno y forma el apresorio para posteriormente iniciar la producción de enzimas que degradan la pared celular (Benítez *et al.*, 2004).

Por lo señalado anteriormente, varias especies de *Trichoderma* han sido ampliamente calificadas como agentes eficaces en el control biológico de las enfermedades causadas por estos patógenos, tanto en condiciones *in vitro* como *in situ*, en diferentes áreas geográficas (Bailey *et al.*, 2008; Suárez y Cabrales, 2008; Krauss *et al.*, 2010; Medeiros *et al.*, 2010; Villamil *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2014).

Hay un gran número de investigaciones realizadas en laboratorio que demuestran el efecto biocontrolador de diversas cepas de *Trichoderma* sobre diferentes fitopatógenos por los diferentes mecanismos antagónicos ejercidos por este hongo. No obstante, Chavarria-Vega y Carmona-Solís (2016), afirman que es difícil determinar si *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista solamente mediante la competencia, o si por el contrario, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competencia se lleve a cabo de una forma más eficaz. Así pues, en investigación realizada por Rios-Velazco *et al.* (2016), se reporta que cepas nativas de *Trichoderma* inhibieron significativamente en más del 50% el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Chavarria-Vega y Carmona-Solís (2016), reportan una de inhibición del crecimiento radial de *F. solani* en un rango de 68-81% por diferentes especies de *Trichoderma*. Maciel *et al.* (2014), demostraron la inhibición del crecimiento en más del 60% del micelio de *Fusarium sambucinum* al confrontarlo con aislados de *Trichoderma*. Resultados similares fueron obtenidos por Pastrana *et al.* (2016), al confrontar a cepas de *Trichoderma* contra *F. solani* y *M. phaseolina*. Hassan *et al.* (2014), evaluando cepas nativas de *Trichoderma* para el control de *F. oxysporum*, causante de la pudrición de raíz de jamaica, reportaron que estas cepas inhibieron el crecimiento micelial del patógeno en un promedio de 81%. Mohandas *et al.* (2010), reportaron que cepas de *Trichoderma* suprimieron significativamente la enfermedad de marchitamiento o mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Por su parte, Gajera y Vakharia (2010), reportaron una alta inhibición del crecimiento de *A. niger* causada por cepas nativas de *Trichoderma* durante un estudio realizado *in vitro*. En la investigación realizada por Bomfim *et al.* (2010), se demostró la inhibición del crecimiento micelial de *R. stolonifer* por aislamientos nativos de *Trichoderma*.

De igual forma, hay un gran número de investigaciones realizadas en campo e invernadero, que reportan el biocontrol ejercido por diferentes especies de *Trichoderma*. Vera *et al.* (2005), Quiroz y Ferrera (2008), Reyes (2008) y Torres *et al.* (2008), evidenciaron el alto potencial antagónico de *Trichoderma* spp., como micoparásito, al penetrar y causar lisis del micelio de *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizotocnia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora*, *Rosellinia*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* y *Cladosporium fulvum* en diferentes cultivos.

En un estudio realizado por Manjunatha *et al.* (2013), que involucró la evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* como agentes biocontrol de la podredumbre de la raíz seca de garbanzo, se reporta que estos aislados se puede utilizar en condiciones de campo para el control de la enfermedad ya que esta disminuyó significativamente. Otros estudios han informado de la acción antagonista eficiente del género *Trichoderma* frente a *Fusarium oxysporum ciceris* y *Fusarium solani* en cultivos de garbanzo y tomate (Morsy *et al.*, 2009; Moradi *et al.*, 2012). Mientras que,

Sivan y Chet (1987), encontraron que *Trichoderma* redujo la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate bajo condiciones de campo. Iguales resultados fueron obtenidos por Adhilakshmi *et al.* (2008), quienes reportan que cepas de este antagonista, redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* en alfalfa. De acuerdo con Srivastavaa *et al.* (2010), varias especies de *Trichoderma* han demostrado ser eficientes en el control de fusariosis en tomate. La aplicación de este hongo, provocó reducción significativa en la incidencia de la marchitez, tanto en plantas mantenidas en macetas como en ensayos de campo, logrando reducir la incidencia y severidad de la enfermedad en 74% y 67% en macetas y en campo, respectivamente. El efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *Fusarium* fue demostrado por Marois *et al.* (1981), Avendaño y Arbeláez (2006), y Ru y Di (2012), en diferentes cultivos. Asimismo, *Trichoderma* ha demostrado que es eficiente para el control de *M. phaseolina* en melón, maíz, berenjena, sorgo y garbanzo (Elad *et al.*, 1986; Larralde-Corona *et al.*, 2008; Manjunatha *et al.*, 2013), y para el control de *Fusarium solani* en frijol, chile y maní (Rojo *et al.*, 2007; Naik *et al.*, 2009; Qualhato *et al.*, 2013).

El papel de *Trichoderma* no es sólo para controlar el crecimiento de patógenos, también hay otros usos, tales como: estimular el crecimiento y desarrollo de la raíz, estimular el crecimiento de la planta, y mejorar las respuestas de defensa de plantas (Harman *et al.*, 2004a; Vinale *et al.*, 2008b; Hohmann *et al.*, 2011). Cano (2011), señala que estos microorganismos son considerados como promotores del crecimiento vegetal, como un PGPF (Hongo promotor del crecimiento vegetal, por sus siglas en idioma inglés: Plant Growth Promoting fungi). Hoyos *et al.* (2009), afirman que debido a la existencia de transposones ABC en las moléculas de *Trichoderma*, se considera un 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 y Puckhaber, 2005; Howell, 2006).

Varias investigaciones señalan que diversas cepas de *Trichoderma* secretan más de 70 metabolitos secundarios, entre ellos: sustancias estimuladoras del crecimiento y

desarrollo de las plantas así como fitohormonas (Howell, 2006; Hoyos *et al.*, 2009; Cano, 2011). Asimismo, Infante *et al.* (2009), sostienen que *Trichoderma* además de incrementar la respuesta de crecimiento en la planta, también puede incrementar la tolerancia al estrés. Igualmente se señala que este PGPF, induce cambios en la composición de la micro flora de las raíces y mejora la absorción de nutrientes (Ruano y López, 2009; López *et al.*, 2011).

Algunas cepas de *Trichoderma* han demostrado capacidad para penetrar en la epidermis y establecer grandes colonizaciones por largos periodos en la superficie de la raíz (Harman *et al.*, 2004a). Singh *et al.* (2010), mencionan que algunos aislamientos de este género de hongo poseen una fuerte capacidad de movilizar y asimilar los nutrientes del suelo, los cuales en su forma original no son accesibles para las plantas, como nitrógeno, fósforo, potasio y carbono orgánico, induciendo al incremento en longitud de las raíces y el posterior aumento de la biomasa, mejorando la tolerancia al estrés hídrico como al déficit de agua. Cutler (1986, 1989), mostró que los metabolitos secundarios producidos por especies de *Trichoderma*, koniningin A y 6-pentyl-alpha pryone, son reguladores del crecimiento de las plantas. También se ha observado que algunas especies de *Trichoderma* produce ácido glucónico y ácido cítrico, disminuyendo el pH del suelo, y aumentando la solubilización de fosfatos, micronutrientes y componentes minerales tales como hierro, magnesio y manganeso (Harman *et al.*, 2004b; Vinale *et al.*, 2008b). Así, se reporta que Ávila-Miramontes *et al.* (2015), encontraron diferencias altamente significativas en el rendimiento del garbanzo, cuando inocularon las semillas con *Trichoderma*.

Este hongo, ha demostrado que mejora el crecimiento de las plantas de lechuga, tomate y pimiento (Vinale *et al.*, 2006). En un estudio en plantas de maíz, las raíces de las plantas inoculadas con *Trichoderma* eran el doble de largo en comparación con las plantas no tratadas (Harman *et al.*, 2004a). De la misma manera, Chang *et al.* (1986), mencionan que algunas especies de *Trichoderma* funcionan como un inductor del crecimiento y desarrollo de hortalizas y flores. Por su parte, Ezziyyani *et al.* (2004), reportaron incrementos en peso seco de plántulas de pimiento al inocular

las semillas con cepas de *Trichoderma*. Asimismo, Jiménez *et al.* (2011), señalan que con la aplicación de este hongo rizosférico, se estimuló el crecimiento y desarrollo de tomate en condiciones protegidas. Al igual, en el trabajo realizado en campo por Srivastavaa *et al.* (2010), se emplearon varias especies de *Trichoderma*, las cuales demostraron ser eficientes para el control de la fusariosis, y a la vez incrementaron el rendimiento de tomate en un 20%. Yedidia *et al.* (1999), en condiciones hidropónicas, demostraron la capacidad de *Trichoderma* de penetrar las raíces de plántulas de pepino y de incrementar la actividad de la peroxidasa y la quitinasa a las 48 y 72 horas, respectivamente. Este resultado se observó tanto en las raíces como en las hojas de las plantas tratadas, mostrando evidentemente que *Trichoderma* puede inducir los mecanismos de defensa en plantas de pepino.

Ahora bien, incrementos en un 30% de la germinación de semillas de pepino, así como aumentos de un 95% del área radical, 45% de la altura del vástago y 80% de área foliar fueron reportados por Yedidia *et al.* (2001), al emplear cepas de *Trichoderma* como inocuo en las semillas. También, Merchán-Gaitán *et al.* (2014), demostraron que la aplicación de este hongo, propició la obtención de frutos de fresa de buena calidad. Por otra parte, López *et al.* (2010), informaron que aislamientos nativos de *Trichoderma*, proporcionaron un mayor desarrollo de raíz e incrementaron el crecimiento en plantas de maíz. Perelló y Dal Bello (2011), reportan que cepas nativas de *Trichoderma* aplicadas a semillas de trigo aumentaron el peso fresco aéreo y de las raíces de las plantas. Rojan *et al.* (2010), en un estudio realizado con *Trichoderma* registraron que la inoculación a semillas de soya con este hongo, proporcionó un mayor crecimiento de planta, evidenciado en un mayor peso seco de tallo, raíz y frutos y una mayor producción, en comparación con las plantas testigo. Asimismo, al tratar semillas de girasol con suspensiones de conidios de *Trichoderma*, se incrementó el crecimiento de las plantas (Yaqub y Shahzad, 2008). Chavarria-Vega y Carmona-Solís (2016), inocularon semillas de melina con *Trichoderma*, reportando incrementos significativos en la germinación, así como en altura de planta. De igual forma, Solano *et al.* (2015), concluyeron que la inclusión de *Trichoderma* en etapa de vivero para plantas de árboles de melina favorecen el crecimiento y desarrollo radicular de la misma. Donosso *et al.* (2008), y Romero *et al.*

(2008), reportan que la inclusión de *Trichoderma* en plantas de vivero mejoró significativamente el desarrollo radicular de las plantas de *Pinus* y *Eucaliptus*. Hohmann *et al.* (2011), informaron de que el uso de *Trichoderma* en recubrimiento con una película de inóculo en las semillas y a través de esporas de pulverización en suspensión después de la siembra son eficaces en el tratamiento de semillas de *Pinus radiata* con incremento en la longitud de las plántulas y el peso seco de raíz.

Por otra parte, Vinale *et al.* (2008b), aislaron los principales metabolitos secundarios producidos por algunos aislamientos de *Trichoderma*, extrayendo siete de ellos, con el fin de valorar sus efectos sobre el desarrollo de plantas de tomate y canola, y evaluar la inducción de los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de los hongos patógenos *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimu*. Los diferentes metabolitos redujeron significativamente la severidad e incidencia de la enfermedad en las plantas y aumentaron el desarrollo y crecimiento de las mismas. De la misma manera, en un estudio de plantas de pepino, la aplicación de especies de *Trichodera* indujo una respuesta sistémica de dos genes de defensa que codifican a phenylalanine y hydroperoxidase lyase, así como la acumulación sistémica de fitoalexinas contra *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Yedidia *et al.*, 2003).

## CAPÍTULO II

### CONTROL DE LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) POR ALGUNOS MICROORGANISMOS NATIVOS DE SINALOA, MÉXICO, BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO

Luz del Carmen Oliva Ortiz<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz<sup>1</sup>, Rogelio Sosa Pérez<sup>2</sup>, Leopoldo Partida Ruvalcaba<sup>3</sup>, Julio Arciniega Ramos<sup>1</sup> y Carlos Alfonso López Orona<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa,<sup>2</sup>Centro de Ciencias de Sinaloa,  
<sup>3</sup>Universidad Tecnológica de Culiacán, carretera Culiacán-Imala km 2, en la Ciudad Educadora del Saber, C. P. 80014, Culiacán de Rosales, Sinaloa, México. \*Responsable de correspondencia, Email: [clopezorona@uas.edu.mx](mailto:clopezorona@uas.edu.mx)

#### RESUMEN

El incremento de la marchitez vascular del garbanzo en Sinaloa, y la dificultad en el control de la misma por uso exagerado de agroquímicos que disminuyen la biodiversidad y contaminan el medio ambiente, obligan a desarrollar medidas sustentables para limitar esta enfermedad, tal es el caso del biocontrol microbiano. El objetivo del trabajo fue determinar en condiciones de laboratorio e invernadero, el efecto protector contra la fusariosis vascular, así como su efecto promotor del crecimiento en plantas de garbanzo, por cepas bacterianas y fúngicas rizosféricas nativas del centro de Sinaloa. Previamente se determinó la inhibición de estas cepas antagonistas sobre el crecimiento radial de *Foc* raza 5, principal agente causal de esta enfermedad en el centro de Sinaloa, mediante la técnica de cultivo dual, empleando como medio de cultivo PDA para realizar las confrontaciones. En invernadero se montaron bioensayos durante los ciclos agrícolas 2012-2013 y 2013-2014, donde las semillas de garbanzo fueron inoculadas con cepas bacterianas a una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> con las cepas fúngicas y posteriormente fueron sembradas en macetas y distribuidas bajo diseño completamente al azar. En el primer ciclo, en etapa de floración, mediante escala subjetiva se evaluaron vigor de planta, marchitez en follaje y cáncer de raíz y en

valores paramétricos, la altura de planta (cm), verdor (unidades SPAD 502) y peso fresco y seco (g); en el ciclo 2013-2014 además de estas variables se evaluó diámetro de tallo (mm) y rendimiento (g planta<sup>-1</sup>). Las cepas de *Trichoderma* sp. HRG-060 y *Bacillus* sp. T442 fueron las más eficaces para controlar la enfermedad ya que redujeron en promedio, más del 30% la podredumbre en raíz en relación al control negativo, y además, propiciaron condiciones para que las plantas incrementaran el verdor y tuvieran mayor crecimiento y desarrollo.

**Palabras clave:** *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum ciceris*

### ABSTRACT

The increase of the vascular wilt of the chickpea in Sinaloa, and the difficulty controlling it by exaggerated use of agrochemicals that reduce biodiversity and contaminate the environment, require the development of sustainable measures to limit this disease, such as microbial biocontrol. The objective of this work was to determine the potential of some bacterial and fungal strains native to Sinaloa as biocontrol agents of this disease in chickpea plants cultivated in greenhouse, where, the inhibition of these antagonist strains was previously determined on the radial growth of *Foc* race 5, main causal agent of this disease in the center of Sinaloa, through the dual culture technique, using as PDA culture medium to carry out the confrontations. In the greenhouse, bioassays were set up during the 2012-2013 and 2013-2014 agricultural cycles, where chickpea seeds were inoculated with bacterial strains at a concentration of  $1 \times 10^8$  cfu mL<sup>-1</sup> and  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> with fungal strains and then they were planted in pots and distributed under completely random design. In the first cycle, in the flowering stage, plant height, foliage wilt and root necrosis were evaluated by means of a subjective scale. Plant height (cm), chlorophyll (SPAD 502 units) and fresh and dry weight (g); in the cycle 2013-2014, in addition to these variables, stem diameter (mm) and yield (g plant<sup>-1</sup>) were evaluated. The strains of *Trichoderma* sp. HRG-060 and *Bacillus* sp. T442 were the most effective to control the disease, since they reduced, on average, more than 30% root rot in relation to the

negative control, and also allowed conditions to increase the greenness in the plants and have greater growth and development.

**Palabras clave:** *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum ciceris*

## INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa alimenticia más importante en el mundo después del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) En Sinaloa (México) el cultivo de garbanzo es de gran importancia, principalmente por ser un generador de divisas, ya que casi la totalidad de su producción está destinada a la exportación, lo que convierte a este estado en el principal productor y exportador de garbanzo blanco de México (Guerrero *et al.*, 2015). La superficie sembrada en Sinaloa con esta leguminosa, en el 2013, fue de 61 600 ha, con una producción de 103 645 toneladas (SIAP, 2014). Sin embargo, el principal factor limitante en la producción de este cultivo en el mundo es la enfermedad de la fusariosis vascular del garbanzo ocasionada por el patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez y Jiménez, 2011), originando pérdidas que van del 10 al 40% de la cosecha anual, incluso devastar al cultivo por completo en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Guerrero *et al.*, 2015). En Sinaloa, la fusariosis vascular del garbanzo es la enfermedad de mayor importancia, (Velarde *et al.*, 2013), mismo que es difícil de controlar químicamente; en base a lo anterior y al problema de la contaminación, el uso de agentes de control biológico es justificado. Es importante utilizar cepas de microorganismos antagonistas que sean nativas y que permitan tener mayores posibilidades de éxito por su probada adaptación al medio ambiente donde fueron obtenidas. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* el potencial biocontrolador de las cepas rizosféricas bacterianas y fúngicas, previamente aisladas, contra *Foc* raza 5, principal agente causal de la fusariosis vascular, mediante bioensayos de confrontación efectuados en laboratorio y determinar el efecto protector de las cepas antagónicas contra fusariosis vascular, así como la estimulación del crecimiento y rendimiento de garbanzo en inverndero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de los aislamientos

Se utilizó el aislamiento 303CS de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (número de accesión KJ000584) proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras (Velarde-Félix *et al.*, 2013). Se seleccionaron y activaron las siguientes cepas pertenecientes a la colección del Centro de Ciencias Sinaloa (CCS): bacterias del género *Bacillus* sp. cepas T442, T3141; bacterias del género *Pseudomonas* sp. cepas T162, 7A1 y 751; hongos del género *Trichoderma* sp. cepas HRG-050, HRG-060 y HRG-083; las cuales previamente fueron aisladas de diferentes campos cultivados con garbanzo y con presencia de la enfermedad, presentándose la ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Ubicación geográfica de las cepas bacterianas y fúngicas antagonistas seleccionadas para ensayos *in vitro* e *in situ*.

Cepa antagonista	Latitud	Longitud
7A1	24°36'14.2" Norte	107°23'56.2" Oeste
751	24°49'30.6" Norte	107°31'55.8" Oeste
T162	24°34'15.2" Norte	107°13'14.0" Oeste
T442	24°40'54.8" Norte	107°39'58.0" Oeste
T3141	24°45'18.3" Norte	107°28'23.5" Oeste
HRG-050	24°37'49.0" Norte	107°26'17.3" Oeste
HRG-060	24°19'14.7" Norte	107°21'43.2" Oeste
HRG-083	24°34'15.4" Norte	107°34'37.2" Oeste

### Activación de los aislamientos

El experimento se realizó en el laboratorio e invernadero del CCS, en Culiacán, Sinaloa, México. Las bacterias se cultivaron por asadas en placas Petri con medio de cultivo a base de Agar FLO (20 g de mezcla de peptonas, 14 g de agar-agar, 15 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 g de MgSO<sub>4</sub> y 1.0 L de H<sub>2</sub>O destilada) para las cepas de *Pseudomonas*; medio de agar nutritivo para *Bacillus* (5 g de peptona de gelatina, 3 g de extracto de

carne, 15 g de agar- agar, 1 L H<sub>2</sub>O destilada); las cepas antagonistas fúngicas y la cepa de *Foc* raza 5, se crecieron por el método de inclusión de porción (Leslie y Sumerell, 2006), para ello, discos de un cm de diámetro de cada cepa fueron colocados en el centro de las placas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (4.0 g de infusión de papá, 20 g de dextrosa, 15 g de agar y pH final de 5.6 ± 0.2). Las placas fueron incubadas a 28 °C, las bacterias durante 24 h y los hongos por cinco días.

### **Pruebas de antagonismo *in vitro* de los antagonistas frente a *Foc* raza 5**

La actividad antagónica de las cepas se estudió mediante la técnica de cultivo dual (Ezziyani *et al.*, 2004). Estas pruebas se efectuaron en placas Petri con medio de cultivo PDA. En la confrontaciones de las cepas bacterianas frente a *Foc* raza 5 la siembra fue en el centro de la placa por asada gruesa, donde tres días previos se dispuso un cm de diámetro del fitopatógeno crecido en PDA en un extremo de la placa. Para las cepas fúngicas antagonistas, se empleó el método de porción para la siembra, colocándose en un extremo un disco de un cm de diámetro de *Foc* raza 5 y cinco días después se sembró al otro extremo un disco del mismo tamaño del antagonista. Se evaluaron ocho tratamientos que consistieron en la confrontación de cada una de las cepas antagonistas frente a *F. oxysporum ciceris* raza 5 y un crecimiento puro del fitopatógeno sin antagonista, con cuatro repeticiones, en un diseño experimental completamente al azar. Cada repetición consistió en una placa Petri. Las placas inoculadas fueron incubadas a 28 °C por siete días. La evaluación de la capacidad antagónica de las cepas, fue determinada mediante el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), empleando la fórmula utilizada por Suárez *et al.* (2008):  $PICR = [(R1-R2)/100]$ ; donde, PICR es el Porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio del fitopatógeno; R1 es el crecimiento radial mayor (radio del micelio del patógeno-testigo); y R2 es el radio menor (radio del micelio del patógeno en cultivo dual). Los datos del porcentaje de inhibición fueron sometidos a la prueba de normalidad y de homogeneidad de varianza; las diferencias entre tratamientos se analizaron con PROC ANOVA y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (P<0.05) en SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

## Producción del inóculo

La producción de inóculo de los antagonistas se realizó en matraces de 500 mL, tomando el material biológico con asada y bajo condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar y utilizando como medio de cultivo para *Pseudomonas* 300 mL de caldo de soya triptocaseína (17 g de peptona de caseína, 3 g de peptona de soya, 5 g de NaCl, 2.5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.5 g de dextrosa y pH final de 7.3 ± 0.2); para *Bacillus* se empleó 300 mL de caldo nutritivo (5 g de peptona, 3 g de extracto de carne y pH final 6.9 ± 0.2); para la producción de inóculo de *Trichoderma* se empleó 300 mL de agar papa dextrosa (PDA). Una vez inoculados los matraces con su respectiva cepa, se procedió a incubarlos a 28 °C, con agitación de 150 RPM durante cinco días, para obtener suficiente biomasa. Después, su contenido fue colocado en tubos para centrífuga Falcón de 50 mL para cosechar la biomasa, empleándose una centrífuga (Sigma 3–18P), por 20 minutos a 3800 RPM, a temperatura ambiente. La cuantificación del inóculo bacteriano se determinó hasta alcanzar una turbidez igual al estándar 0.5 McFarland (Ortigoza y Ruiloba 1998), para obtener una concentración de 1x10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>. Para la cuantificación del inóculo fúngico se utilizó la determinación de conidios en líquido por el método de la cámara de Neubauer (Ferrón, 1981), obteniéndose una concentración de 1x10<sup>8</sup> conidios mL<sup>-1</sup>.

## Montaje del bioensayo en invernadero

Con el inóculo, semillas de garbanzo variedad Blanco Sinaloa fueron tratadas en ambos ensayos; una vez inoculadas las semillas, estas fueron sembradas en macetas que contenían como sustrato 12 litros de una mezcla de suelo y sustrato orgánico (Peat Moss) en relación 3:1 en base a un diseño experimental completamente al azar. Previo a la siembra, el suelo fue inoculado con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) raza 5, principal agente causal de la marchitez del garbanzo en la zona centro de Sinaloa (Velarde *et al.*, 2013). Los tratamientos que se establecieron en los dos ciclos evaluados se presenta en el Cuadro 4, se hicieron cinco repeticiones por tratamiento y cada repetición estaba formada por dos plantas, en las cuales se evaluaron las variables respuesta del efecto protector y estimulación del crecimiento. La siembra se efectuó en el mes de diciembre de los años 2012 y 2013.

Las plantas fueron regadas empleando la solución nutritiva de Murashige-Skoog (1962). Se observó el crecimiento y desarrollo de las plantas hasta floración para el ciclo agrícola 2012-2013 y hasta cosecha en el ciclo 2013-2014.

Cuadro 4. Tratamientos para la evaluación del biocontrol de la marchitez en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero.

Tratamiento	Ciclo agrícola 2012-2013	Ciclo agrícola 2013- 2014
T1	Testigo. Semillas sin inocular	Testigo. Semillas sin inocular
T2	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 7A1	Fungicida químico (Benomilo)
T3	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. T162	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 7A1
T4	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 751	Cepa <i>Bacillus</i> sp. T442
T5	Cepa de <i>Foc</i> raza 5	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 751
T6	Cepa <i>Trichoderma</i> sp. HRG-050	Cepa <i>Bacillus</i> sp. T3141
T7	Cepa <i>Trichoderma</i> sp. HRG-060	Cepa <i>Trichoderma</i> sp. HRG-050
T8	Cepa <i>Trichoderma</i> sp. HRG-083	Cepa <i>Trichoderma</i> sp. HRG-060
T9	Cepa <i>Bacillus</i> sp. T442	
T10	Cepa <i>Bacillus</i> sp. T3141	

Las variables de respuesta evaluadas fueron: vigor de planta, tomando en cuenta porcentajes de desarrollo y flacidez; marchitez en follaje, considerando su porcentaje de clorosis; cáncer en raíz, evaluado en porcentaje de necrosis; para estas tres variables se emplearon escalas subjetivas presentadas en el Cuadro 5.

También se evaluó el verdor en planta, empleando un SPAD 502, marca Spectrum Technologies, Inc.; altura de planta (cm) mediante cinta metálica, considerando desde la base del tallo hasta la parte más alta de la planta; peso fresco (g), utilizando balanza digital; peso seco (g), de plantas deshidratadas en estufa a 80 °C durante 24 h en el ciclo agrícola 2012-2013. Para el ciclo 2013-2014 además de estas variables, se evaluaron diámetro de tallo (mm), mediante un vernier digital y rendimiento ( $\text{g planta}^{-1}$ ), en una balanza digital.

Cuadro 5. Escala subjetiva para estimar el vigor, marchitez en follaje y cáncer de raíz en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero.

Escala	Vigor de planta	Marchitez en follaje	Cáncer en raíz
1	0% Menos vigor	No marchitez en follaje	No cáncer
2	25% Ligeramente vigoroso	25 % del área del follaje enferma	25% del área de raíces enfermas
3	50% Vigor medio	50% del área del follaje enferma	50% del área de raíces enfermas
4	75% Vigorosa	75% del área del follaje enferma	75% de las raíces enfermas
5	100% Vigorosa	Follaje totalmente enfermo	Raíces completamente enfermas

Para la evaluación estadística se consideraron los valores obtenidos de las variables respuesta con sus réplicas por tratamiento y se sometieron a la prueba de Kruskal Wallis y análisis de varianza para las variables no paramétricas y paramétricas respectivamente, así como la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey  $P < 0.05$ ) en el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad antagónica de las cepas bacterianas y fúngicas

El crecimiento radial de *F. oxysporum ciceris* raza 5 disminuyó significativamente al ser evaluado *in vitro* frente a las cepas rizosféricas antagonistas en un rango de inhibición de 80.07 a 38.89% del crecimiento de *Foc* (Cuadro 6). Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) del fitopatógeno se presentaron con las cepas de *Trichoderma* sp., donde el mayor PICR se observó en la confrontación de la cepa HRG-060 contra *Foc*, el cual fue estadísticamente igual al PICR ejercido por la cepa HRG-050 y significativamente mayor al resto de las cepas antagonistas. Con respecto a las cepas bacterianas, el mayor PICR se observó en la cepa T442, la cual inhibió a *Foc* en un 59.26%.

Cuadro 6. Crecimiento radial *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, y porcentaje de inhibición de su crecimiento micelial por antagonistas microbianos rizosféricos de plantas de garbanzo a través de la técnica de cultivo dual.

Cepa	Crecimiento del patógeno en confrontación (cm)	Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial
<i>Trichoderma</i> sp. (HRG-050)	2.07	71.29 ab*
<i>Trichoderma</i> sp. (HRG-060)	1.43	80.07 a
<i>Trichoderma</i> sp. (HRG-083)	2.37	67.13 bc
<i>Pseudomonas</i> sp. (7A1)	3.5	51.39 d
<i>Pseudomonas</i> sp. (T162)	4.4	38.89 e
<i>Pseudomonas</i> sp. (751)	3.47	51.85 d
<i>Bacillus</i> sp. (T442)	2.93	59.26 cd
<i>Bacillus</i> sp. (T3141)	4.23	41.20 e
<i>F. oxysporum ciceris</i> raza 5	7.2	-

\*Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ( $P < 0.05$ ).

Además de disminuir el crecimiento de *Foc*, las cepas de *Trichoderma* presentaron una capacidad de sobrecrecimiento así como de esporulación sobre el micelio del patógeno (Figura 1). Asimismo, se observó que la eficiencia en la inhibición del crecimiento de *Foc* por las cepas de *Trichoderma* presentaron diferentes valores, oscilando entre 67.13 y 80.07% y por tanto, distintos efectos antagónicos, resultados que coinciden con Chavarría-Vega y Carmona-Solís (2016), quienes investigaron el biocontrol de *F. solani* por cepas nativas de *Trichoderma*. Diversos investigadores señalan que cepas de la misma especie de *Trichoderma* pueden mostrar diversos grados de agresividad, producir diferentes enzimas y metabolitos antifúngicos, y como consecuencia, diferentes grados de inhibición del crecimiento de fitopatógenos (Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008; Bomfim *et al.*, 2010; Eshetu *et al.*, 2015). Guédez *et al.* (2012), reportaron que cepas autóctonas de *Trichoderma*, no obstante de ser de la misma especie (*T. harzianum*), presentaron diferentes valores de PICR en un rango que osciló de 75 a 51% al confrontarlas con *F. oxysporum* aislado de la rizósfera de plantas de tomate; resultados similares fueron obtenidos por Aponte *et*

al. (2012), quienes reportan comportamiento diferente de cepas de *Trichoderma* en cuanto a la capacidad de inhibir el desarrollo micelial de fitopatógenos. La inhibición del crecimiento micelial de *Foc* probablemente fue debida a dos tipos de antagonismo ejercido por las cepas fúngicas: por competencia por espacio y sustrato así como por el micoparasitismo.

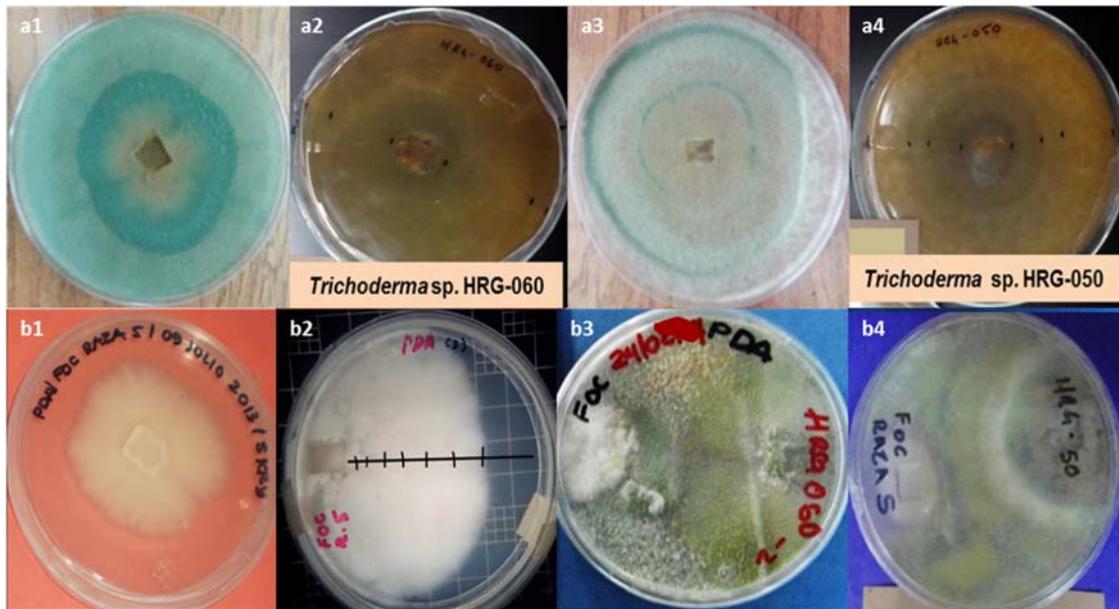


Figura 1. Confrontaciones *in vitro*. Crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. HRG-060, HRG-050 y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (a1-b2). Las colonias de HRG-060 ocuparon el 100 % de la placa al tercer día de la siembra (a1 muestra la parte superior y a2 la parte inferior de la placa). Las colonias de HRG-050 ocuparon el 100% de la placa al cuarto día de la siembra (a3 muestra la parte superior y a4 la parte inferior de la placa). Cepa de *Fusarium oxysporum ciceris* raza 5 (b1) y su crecimiento micelial al séptimo día de la siembra (b2). Micoparasitismo de las cepas antagonista HRG-060 (b3) y HRG-050 (b4), al ser confrontadas *in vitro* contra *Foc* raza 5 al cuarto días de post-inoculación.

Las tres cepas antagonistas fúngicas tuvieron un rápido crecimiento del micelio, al cuarto día de post-incubación habían cubierto el 100% de la caja Petri, sobresaliendo la cepa HRG-060, cuyo cubrimiento lo efectuó al tercer día, y de acuerdo con Guédaza *et al.* (2012), esto indica alto grado de agresividad de esta cepa. En la Figura 1, se muestra la diferente tasa de crecimiento del fitopatógeno con respecto a dos de las cepas de *Trichoderma*, demostrando con ello que se ejerció el antagonismo por competencia; estos resultados están de acuerdo con Martínez *et al.* (2013) quienes registraron que *Trichoderma* sp. tiene una alta capacidad de

competencia por el sustrato. Además la cepa de *Trichoderma* HRG-060 presentó sobrecrecimiento y una fuerte esporulación sobre la colonia del patógeno al cuarto día después de la siembra, situación que también se presentó con los otros dos antagonistas fúngicos al sexto día de la inoculación, demostrando con ello que estas cepas ejercieron el mecanismo de micoparitismo, tal como lo sugiere Reyes *et al.* (2012). Estos resultados coinciden con Ríos-Velazco *et al.* (2016), quienes reportan que cepas nativas de *Trichoderma* inhibieron significativamente en más del 50% el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*. Asimismo, Maciel *et al.* (2014), demostraron la inhibición del crecimiento en más del 60% del micelio de *Fusarium sambucinum* al confrontarlo con aislados de *Trichoderma*. Resultados similares fueron obtenidos por Pastrana *et al.* (2016), al confrontar a cepas de *Trichoderma* contra *F. solani* y *M. phaseolina*.

En la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de las bacterianas contra *Foc* raza 5 fue variado, tanto en las cepas de *Bacillus* sp. como en las de *Pseudomonas* sp. Algunas cepas fueron regularmente inhibidoras para del crecimiento del patógeno, mientras que otras sólo mostraron una actividad limitada (Figura 2). Esto sugiere que el tipo de metabolito antifúngico producido por los aislados puede variar, tal como lo señala Eshetu *et al.* (2015). Los porcentajes de inhibición de *Foc* raza 5 por las cepas bacterianas T442, 751 y 7A1, coinciden con los reportados por diversos autores; en estudios *in vitro* realizados por Abdulkareem *et al.* (2014), se señala que cepas nativas de *Bacillus subtilis* presentaron actividad antagonistas contra *Fusarium* ya que redujo en más del 50% su crecimiento micelial; asimismo, Yezli *et al.* (2015), al emplear cepas de *Bacillus* en confrontación con *F. oxysporum*, reporta inhibición de su crecimiento micelial en rangos que oscilaron entre un 56 y 60%. Ríos-Velasco *et al.* (2016), reportan que al emplear dos cepas nativas de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*, estas inhibieron su crecimiento micelial en un promedio de 46.8%. Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), mostraron la actividad biocontroladora de cepas de *Pseudomonas*, señalando que estas tiene una acción aceptable contra *Fusarium oxysporum*. El grado de eficacia de metabolitos puede variar de acuerdo con la naturaleza, la calidad, la cantidad de antibióticos secretados por los antagonistas (Fekadu y Tesfaye, 2013).



Figura 2. Confrontaciones *in vitro* de las cepas bacterianas rizosféricas contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (sembrado tres días previos a la inoculación); cepas antagonistas de *Bacillus* sp. T442 y T3141 (a1, a2), cepas antagonistas de *Pseudomonas* sp. 751 y 7A1 (a3 y a4) al quinto día de post-inoculación.

### Efecto protector de los antagonistas bacterianos y fúngicos

En el ciclo 2012-2013 se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el vigor de planta (Cuadro 7). En las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060), el vigor fue significativamente mayor que en las plantas de T1 (Testigo) y T5 (Control negativo), superándolos en un 56 y 52%, el resto de los tratamientos fueron estadísticamente igual a T1 y T5. Las plantas del T3 (*Pseudomonas* sp. T162) presentaron el menor vigor, en el resto de los tratamientos las plantas presentaron valores numéricos mayores que el testigo y el control negativo.

En marchitez de follaje y cáncer de raíz (Cuadro 7), se observaron diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, estas variables fueron estadísticamente igual al testigo (T1) y control negativo (T5), aunque si se observaron diferencias numéricas. La menor marchitez se presentó en las plantas de T6 (*Trichoderma* sp. HRG-050), seguidas por T8 (*Trichoderma* sp. HRG-083), y T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060), siendo inferior en un 52.2, 49.3 y 47.9% respectivamente en relación a las plantas del testigo (Figura 3), y en un 63.3, 61.1 y 52.1% con respecto a las plantas cuyas semillas fueron inoculadas con *Foc* (T5).

En cáncer de raíz no se observaron diferencias significativas con respecto al testigo, aunque el menor porcentaje se presentó en las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060), siendo inferior en un 51.5 y 55.4% con respecto a las plantas de T1 y T5.

Cuadro 7. Efecto protector de los antagonistas microbianos sobre la fusariosis vascular del garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2012-2013).

Tratamientos	Vigor de planta (%)	Marchitez de follaje (%)	Cáncer de raíz (%)
T1 = Testigo	38.00 b**	46.00 ab	68.67 ab
T2 = *7A1	59.33 ab	46.00 ab	46.67 b
T3 = T162	34.67 b	70.00 a	92.00 a
T4 = 751	44.67 ab	60.67 ab	61.67 ab
T5 = Control negativo	42.00 b	60.00 ab	74.67 ab
T6 = HRG-050	77.33 ab	22.00 b	49.33 ab
T7 = HRG-060	87.33 a	24.00 b	33.33 b
T8 = HRG-083	50.00 ab	23.33 b	56.67 ab
T9 = T442	60.00 ab	34.67 ab	56.00 ab
T10 = T3141	59.33 ab	28.67 ab	50.00 ab

\*Inoculación de semillas de garbanzo de T2-T4, con cepas de *Pseudomonas* sp.; T5 (Control negativo), inoculación de semillas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; de T7-T8 inoculación con cepas de *Trichoderma* sp.; T9 y T10 inoculación con cepas de *Bacillus* sp.

\*\*Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para P < 0.05.



Figura 3. Reacción de las raíces de plantas de garbanzo variedad Blanco Sinaloa-96 a la inoculación con *F. oxysporum ciceris* raza 5 y microorganismos antagonistas. Testigo (a1); inoculación de semillas con cepas de *Pseudomonas* sp. 7A1, T162 y 751 (a2-a4); inoculación de semillas con *Foc* raza 5, control negativo (a5); inoculación de semillas con cepas de *Trichoderma* sp. HRG-050, HRG-060 y HRG-083 (a6-a8); inoculación de semillas con cepas de *Bacillus* sp. T442 y T3141 (a9 y a10).

En el ciclo 2013-2014 se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos en el vigor (Cuadro 8). En las plantas de T4 (*Bacillus* sp. T442) y T8 (*Trichoderma* sp. HRG-060), el vigor fue significativamente mayor que en las plantas de T1 (testigo) y T2 (químico); en relación a las plantas del testigo, el incremento fue de 30.8 y 27.3% respectivamente, asimismo, en relación al tratamiento químico, el incremento de vigor de T4 y T8 fue de un 26.9 y 22.5% correspondientemente. En marchitez de follaje, se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos (Cuadro 8); a excepción de T3 (*Pseudomonas* sp. 7A1), todos los tratamientos disminuyeron significativamente la marchitez en relación al testigo y fueron estadísticamente iguales a T2 (químico). La menor marchitez se presentó en las plantas de T4 (*Bacillus* sp. T442) y T6 (*Bacillus* sp. T3141).

Cuadro 8. Efecto protector de los antagonistas microbianos sobre la fusariosis vascular del garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2013-2014).

Tratamientos	Vigor de planta (%)	Marchitez de follaje (%)	Cáncer de raíz (%)
T1 = Testigo*	61.60 b****	66.80 a	80.00 a
T2 = Benomilo**	64.00 b	52.20 bc	51.60 cd
T3 = 7A1***	65.00 b	60.80 ab	68.00 b
T4 = T442	80.60 a	45.00 c	45.40 de
T5 = 751	66.20 b	49.80 bc	57.00 c
T6 = T3141	68.00 b	44.40 c	57.60 c
T7 = HRG-050	61.20 b	49.80 bc	46.80 de
T8 = HRG-060	78.40 a	49.40 bc	39.60 e

\* Semillas no inoculadas.

\*\* Tratamiento de semillas con fungicida químico.

\*\*\*Inoculación de semillas de garbanzo de T3 y T5, con cepas de *Pseudomonas* sp.; T4 y T6, con cepas de *Bacillus* sp.; T7 y T8 con cepas de *Trichoderma* sp.

\*\*\*\*Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para  $P < 0.05$ .

Con respecto al cáncer de raíz (Cuadro 8), todos los tratamientos disminuyeron significativamente este síntoma en comparación con el testigo, los menores porcentajes se reportaron en las plantas de T8 (*Trichoderma* sp. HRG-060) y T4

(*Bacillus* sp. T442). Con respecto al tratamiento químico (T2), el porcentaje de cáncer de las plantas de T8 fue significativamente inferior.

El mayor efecto protector contra la fusariosis vascular en los dos bioensayos montados en invernadero, se presentó en los tratamientos basados en la inoculación con las cepas de *Trichoderma* HRG-060 y *Bacillus* T442. Malik y Sindhu (2011), sostienen que entre los diversos microorganismos que habitan la rizósfera, se encuentran bacterias y hongos de los géneros de *Bacillus* y *Trichoderma* que presentan la propiedad de estimular la salud vegetal, empleando una amplia variedad de mecanismos moleculares. Diversas investigaciones señala que cepas de *Trichoderma* sp. producen antibióticos como trichodermina, suzukacilina, trichorzianina, gliotoxina y viridina (Martínez *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2009), y diversos metabolitos como celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas, quitinasas, y  $\beta$ -1-3-Glucanasa (Mukherjee *et al.*, 2008; Paredes-Escalante *et al.*, 2011); además produce sideróforos, los cuales detienen el crecimiento de otros hongos fitopatógenos (Tchameni *et al.*, 2011). Ezziyyani *et al.* (2004), sostienen que la eficiencia de *Trichoderma* para inhibir estos hongos puede deberse, en parte, a su competencia por espacio y nutrientes. Asimismo, cepas de *Bacillus* sp. han demostrado poseer características como excelentes agentes biocontrol, al producir antibióticos conocido como iturinas, bacilysin, fengycin, surfactin, mycosubtilin y fungistatin, que tiene acción efectiva contra fitopatógenos (Arguelles-Arias *et al.*, 2009; Babaloba, 2010); de acuerdo con Leclere *et al.* (2005), la producción de micosubtilina tiene importantes propiedades antagónicas frente a *F. oxysporum*. Los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por varios investigadores. Así, Verma *et al.* (2014), en ensayo realizado en garbanzo, reportan que diferentes cepas de *Trichoderma*, mostraron actividad antagonista contra *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*), mejorado significativamente el control de la enfermedad en el cultivo, recomendando su uso como agente biocontrol en la producción de garbanzo. De la misma manera, Manjunatha *et al.* (2013), al evaluar aislados nativos de *Trichoderma* como agentes biocontrol de la podredumbre de la raíz seca de garbanzo, reportaron que estos aislados se pueden utilizar en condiciones de campo para el control de la enfermedad, ya que esta disminuyó

significativamente. Por su parte, Moradi *et al.* (2012), estudiaron el efecto de cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* en la supresión de la marchitez causada por *Foc* en garbanzo, reportando reducciones significativas en la gravedad de la enfermedad en un 40% en comparación con el control. Similares resultados fueron reportados por Da Silva *et al.* (2011), quienes señalan que aislados caracterizados como *Trichoderma* fueron eficaces en la protección contra la antracnosis en pepino, al reducir la gravedad de la enfermedad en un rango de 46-85%. Hassan *et al.* (2014), evaluando cepas nativas de *Trichoderma* y *Bacillus* para el control de *F. oxysporum*, causante de la pudrición de raíz de jamaica, reportaron que estas cepas inhibieron el crecimiento micelial del patógeno en un promedio de 81 y 77%. Los datos de esta investigación también concuerdan con Karimi *et al.* (2012), quienes al evaluar cepas del género *Bacillus*, aislada de la rizósfera de plantas de garbanzo contra *Foc* bajo condiciones de invernadero, reportaron un incremento significativo en el control de la enfermedad en un rango de 15.8 a 44.8% con respecto al control. Por su parte, Eshetu *et al.* (2015), al tratar semillas de haba con cepas nativas de *Bacillus* en invernadero, reportaron que las plantas tratadas mostraron una reducción significativa de la gravedad de la pudrición negra de la raíz provocada por *F. solani*, mayores al 50-78% sobre el control. De la misma manera, investigaciones realizadas tanto en laboratorio como en campo, indican que cepas del género *Bacillus* son de los agentes más eficaces en el control de *Fusarium oxysporum* (Alamri *et al.*, 2012). Asimismo, Oh *et al.* (2011), demostraron que cepas de *Bacillus* redujeron la marchitez provocada por *F. oxysporum* y aumentaron el vigor en plantas de chile.

El efecto protector otorgado por la cepa de *Trichoderma* HRG-060, podría ser proporcionado por los principales mecanismos antagónicos desplegados por este antagonista. De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro*, esta cepa ejerce la actividad biocontrol por competencia, así como por micoparasitismo. Droby *et al.* (2009) y Sharma *et al.* (2009), afirman que la acción más común mediante la cual *Trichoderma* ejerce el antagonismo es mediante la competencia por nutrientes y espacio; de acuerdo con Babaloba (2010), esta se da generalmente por carbono, hierro y nitrato, y es favorecida por la alta velocidad de crecimiento de *Trichoderma* y secreción de metabolitos que frenan o eliminan a los competidores en el

microambiente. Asimismo, un criterio importante es la acción rápida del antagonista en superar la inhibición del patógeno y poder parasitarlo (Sharman, 2011). El micoparasitismo de la cepa de *Trichoderma* observado *in vitro*, es debido probablemente a la producción y regulación de enzimas líticas y de degradación tales como celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas, como lo menciona Mukherjee *et al.* (2008), lo cual contribuyó posiblemente en la disminución de la enfermedad al inocular las semillas con esta cepa. Diversas cepas de *Trichoderma* han sido explotadas como agentes de control biológico de patógenos, incluyendo hongos y nematodos, debido a la producción de enzimas de degradación de la pared celular (Vinale *et al.*, 2008a). Por otra parte, la producción de sideróforos es un mecanismo que aparte de estimular el crecimiento vegetal, contribuye en la sanidad de la planta, pues el hierro participa como cofactor de reacciones enzimáticas, por lo que la limitación de este macronutriente es letal para los microorganismos, y diversas investigaciones señalan que ciertas cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* tienen la capacidad de producirlos (Dehner *et al.*, 2010; Tenorio *et al.*, 2012). El efecto protector de la cepa de *Bacillus* T442, podría ser ocasionado por la inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno, que se observó en laboratorio, demostrando su efecto de antibiosis por la producción de sustancias difusibles que restringen y suprimen el crecimiento del fitopatógeno, tal como lo señala Eshetu *et al.* (2015). Diversas cepas de *Bacillus* producen diferentes tipos de antibióticos que se utilizan en el control biológico de patógenos de plantas (Arguelles-Arias *et al.*, 2009). Karimi *et al.* (2012), demostraron la capacidad de *Bacillus* para la producción de cianuro de hidrógeno, sideróforos, proteasa y el ácido indol acético (IAA), productos que inhiben el crecimiento de patógenos. Hay estudios que señalan la producción de biosurfactantes por cepas de *Bacillus*, los cuales están involucrados en la formación de una biopelícula gruesa y estable que, junto con la liberación de moléculas proteicas antifúngicas posicionan a esta bacteria en una situación ventajosa en relación a la competencia que existe en la microbiota del suelo (Sarti y Miyazaki, 2013). Por tanto, la colonización efectiva de las raíces de las plantas de garbanzo y la producción de sustancias inhibitorias por las cepas antagonistas HRG-060 y T442,

podrían haber contribuido en su capacidad para disminuir la infección por *Foc* y controlar la enfermedad.

### Promoción del crecimiento por los antagonistas bacterianos y fúngicos

En el efecto de estimulación del crecimiento de las plantas de garbanzo por las cepas rizosféricas en el ciclo 2012-2013, se encontró que en altura de planta no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero si hubo variaciones numéricas (Cuadro 9). La mayor altura se presentó en las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060), siendo superior en un 28.5% con respecto a las plantas del testigo. En el índice de verdor se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El verdor de las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) fue significativamente superior con respecto a T1 (testigo) y T5 (control negativo), con un incremento de 78.5 y 85.9% respectivamente; en los tratamientos restantes, a excepción de T3 (*Pseudomonas* sp. T162), también se presentaron incrementos en el verdor, pero no fueron estadísticamente diferentes a T1 y T5.

Cuadro 9. Efecto de la inoculación de semillas con antagonistas bacterianos y fúngicos en los parámetros de crecimiento de plantas de garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2012-2013).

Tratamientos	Altura de plana (cm)	Índice de verdor (SPAD)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
T1 = Testigo	31.37 a	47.98 bc**	6.37 abc	3.10 b
T2 = 7A1*	37.33 a	57.40 ab	11.067 a	8.47 a
T3 = T162	27.83 a	30.97 c	2.167 c	1.07 b
T4 = 751	29.63 a	50.07 b	3.30 bc	1.73 b
T5 = <i>Foc</i> raza 5	33.27 a	42.77 bc	4.53 abc	2.27 b
T6 = HRG-050	35.50 a	60.63 ab	6.57 abc	2.87 b
T7 = HRG-060	40.30 a	75.37 a	9.03 ab	4.87 ab
T8 = HRG-083	28.57 a	53.37 b	10.20 a	4.93 ab
T9 = T442	29.83 a	57.17 ab	10.30 a	4.77 ab
T10 = T3141	32.13 a	60.17 ab	10.87 a	6.00 ab

\*Inoculación de semillas de garbanzo de T2-T4, con cepas de *Pseudomonas* sp.; T5, con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; de T7-T8 con cepas de *Trichoderma* sp.; T9 y T10 con cepas de *Bacillus* sp.

\*\*Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para  $P < 0.05$ .

En el peso fresco y peso seco también se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, los tratamientos basados en la inoculación con los antagonistas, fueron estadísticamente iguales al testigo y control negativo. Los mayores valores se observaron en T2 (*Pseudomonas* sp. 7A1), T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060), T8 (*Trichoderma* sp. HRG-083), T9 (*Bacillus* sp. T442) y T10 (*Bacillus* sp. T3141).

Con respecto al ciclo 2013-2014, en altura de planta no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, presentándose variaciones numéricas (Cuadro 10). La mayor altura se observó en las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-050). En el diámetro de tallo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, los tratamientos basados en la inoculación con los antagonistas, fueron estadísticamente iguales a T1 (testigo) y T2 (químico), no obstante, a excepción de T3 (*Pseudomonas* sp. 7A1), en las plantas de todos los tratamientos, el grosor de tallo fue numéricamente mayor en comparación de las plantas de T1 y T2. En el índice de verdor se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El verdor de las plantas de T5 (*Pseudomonas* sp. 751) y T4 (*Bacillus* sp. T442) fue significativamente superior al obtenido por las plantas del testigo, con un incremento de 24.6 y 22.4% respectivamente, el resto de los tratamientos fueron estadísticamente iguales al testigo; sin embargo, numéricamente, el índice de verdor fue mayor en todos los tratamientos donde se empleó la inoculación de semillas con los antagonistas rizosféricos. Con respecto al peso fresco, se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, siendo este significativamente superior en las plantas de T4 (*Bacillus* sp. T442) en relación a las plantas del testigo; en los tratamientos restantes, a excepción de T3 (*Pseudomonas* sp. 7A1) aunque no estadísticamente, se presentaron incrementos en el peso fresco en comparación a las plantas de T1 (testigo) y T2 (químico). En el peso seco también se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, las plantas de los tratamientos 4 (*Bacillus* sp. T442) y 8 (*Trichoderma* sp. HRG-060) mostraron incrementos significativos en el peso seco con respecto a las plantas de T1 y T2; y aunque no hubo diferencias estadísticas en los tratamientos 5, 6 y 7, el peso seco de las plantas de estos tratamientos fue superior al obtenido por la plantas del testigo y de T2

(químico). En el rendimiento se observaron diferencias significativas entre los tratamientos; las plantas de T4 (*Bacillus* sp. T442), T8 (*Trichoderma* sp. HRG-060) y T5 (*Pseudomonas* sp. 751) presentaron incrementos significativos en el rendimiento con respecto a las plantas del testigo, siendo estos del orden de 78.7, 67.0 y 67.0% para T4, T8 y T5 correspondientemente; esta misma tendencia se presentó con respecto a las plantas del tratamiento químico.

Cuadro 10. Efecto de la inoculación de semillas con antagonistas bacterianos y fúngicos en los parámetros de crecimiento y rendimiento de plantas de garbanzo bajo condiciones de invernadero (Ciclo 2013-2014).

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Índice de verdor (SPAD)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )
T1 = Testigo*	70.27a	3.76 ab****	45.32 c	29.53 bc	20.69 c	3.42 cd
T2 = Benomilo**	64.06a	3.64 ab	47.58 bc	27.59 c	20.91 c	3.63 cd
T3 = 7A1***	52.63a	2.86 b	50.10 abc	26.97 c	19.92 c	1.82 d
T4 = T442	72.42a	4.04 ab	55.45 ab	41.73 a	30.03 a	6.11 a
T5 = 751	63.91a	4.26 a	56.49 a	33.03 bc	23.75 bc	5.71 ab
T6 = T3141	72.43a	4.26 a	49.81 abc	33.40 bc	22.19 bc	3.83 bc
T7 = HRG-050	74.25a	4.04 ab	48.65 abc	32.94 bc	22.24 bc	3.04 cd
T8 = HRG-060	66.32a	4.26 a	50.76 abc	35.57 ab	26.44 ab	5.71 ab

\*Semillas no inoculadas.

\*\* Tratamiento de semillas con fungicida químico.

\*\*\*Inoculación de semillas de garbanzo de T3 y T5, con cepas de *Pseudomonas* sp.; T4 y T6, con cepas de *Bacillus* sp.; T7 y T8 con cepas de *Trichoderma* sp.

\*\*\*\*Medias con letras no comunes dentro de cada variable difieren estadísticamente según prueba de Tukey para  $P < 0.05$ .

Los tratamientos con las cepas antagonistas que causaron el mayor efecto de promoción del crecimiento en las plantas de garbanzo en ambos ensayos fueron *Bacillus* sp. T442 y *Trichoderma* sp. HRG-060. Diversas sustancias que promueven el crecimiento vegetal son producidas por ciertos microorganismos rizosféricos, entre ellos bacterias del género *Bacillus* y hongos del género *Trichoderma*, y pueden influir directa o indirectamente sobre el metabolismo y fisiología de la planta (Bhattacharyya y Jha, 2012), mediante la síntesis y excreción de sustancias fitoestimuladoras, como fitohormonas y compuestos orgánicos volátiles que refuerzan la inmunidad vegetal (Ahmad *et al.*, 2008; Ambreen y Shahida, 2010). Varios investigadores señalan que

la inoculación de semillas con cepas de *Bacillus*, promueven el crecimiento vegetal, ocasionando incremento en rendimiento, debido a que pueden actuar como fertilizadoras del suelo por su capacidad para movilizar nutrientes y producir fitohormonas, permitiendo optimizar los procesos de floración, germinación y establecimiento de la plántula (Kumar *et al.*, 2011; Malviya *et al.*, 2012; Eshetu *et al.*, 2015). Guzmán *et al.* (2012), señalan que la estimulación del crecimiento por cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, es debido a la fijación del nitrógeno atmosférico y solubilización del fósforo. Asimismo, diversos trabajos señalan que algunas cepas de *Trichoderma* secretan más de 70 metabolitos secundarios y fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Hoyos *et al.*, 2009; Cano, 2011). Se ha observado que algunas especies de *Trichoderma* produce diversos ácidos que disminuyen el pH del suelo, aumentando la solubilización de fosfatos y micronutrientes, como hierro y manganeso (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008b). Singh *et al.* (2010), mencionan que algunos aislamientos de este hongo poseen una fuerte capacidad de movilizar y asimilar los nutrientes del suelo, los cuales en su forma original no son accesibles para las plantas, reportando en su investigación mediante un análisis de suelo un aumento en la disponibilidad de P, K, N, Fe, Mn y Zn del orden de 65, 44, 27, 100, 79 y 66% respectivamente y una disminución del pH de un 6%, induciendo al incremento en longitud de las raíces y el posterior aumento de vigor y biomasa, mejorando la tolerancia al estrés hídrico. Los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por Karimi *et al.* (2012) y Verma *et al.* (2009), quienes reportan incrementos significativos en altura, peso fresco, peso seco y rendimiento en plantas de garbanzo que fueron inoculadas con aislamientos de *Bacillus* y *Pseudomonas* en comparación con el testigo. Asimismo, Wani *et al.* (2010), reportan que el crecimiento, contenido de clorofila y rendimiento se mejoró significativamente al emplear cepas de *Bacillus* como bioinoculante. Resultados similares fueron reportados en otros cultivos al emplear aislamientos de *Bacillus* como inóculo (Park *et al.*, 2013; Nuncio-Orta *et al.*, 2015; Eshetu *et al.*, 2015). De la misma manera, el efecto estimulador de crecimiento obtenido con la cepa *Trichoderma* HRG-060, son similares a los reportados por Verma *et al.* (2014), quienes reportan incrementos en el crecimiento y rendimiento del garbanzo al

emplear cepas *Trichoderma* como inóculo; en investigación realizada en garbanzo por Ávila-Miramontes *et al.* (2015), se obtuvieron rendimientos significativamente más altos en comparación con el tratamiento de fertilización química. Los resultados también son semejantes a los obtenidos por García *et al.* (2012), quienes demostraron que la inoculación de semillas de papa con cepas nativas de *Trichoderma* incrementaron significativamente el diámetro de tallo, fotosíntesis, peso fresco, peso seco y rendimiento, siendo estos incrementos mayores a 15.0, 67.0, 68.0, 85.0 y 400% respectivamente, en comparación con el testigo. De igual forma, Solano *et al.* (2015), concluyeron que la inclusión de *Trichoderma* en etapa de vivero para plantas de árboles de melina favorecen el crecimiento y desarrollo radicular de la misma. Resultados similares han sido reportados en diversos cultivos (Da Silva *et al.*, 2011; Akrami *et al.*, 2011; Perelló y Dal Bello, 2011). Este efecto estimulador de *Bacillus* sp. T442 y *Trichoderma* sp. HRG-060 podría ser atribuido a su acción indirecta mediante el control del patógeno, solubilidad de nutrientes del suelo y producción de hormonas vegetales como citoquininas, giberelinas, auxinas y ácido indol-3-acético, que favorece el crecimiento de las raíces, asimismo, el incremento en verdor podría indicar una mayor tasa fotosintética en las plantas tratadas, afectando así la biomasa, traducándose en una mayor producción, traslado y acumulación de azúcares, ocasionando incrementos significativos en el rendimiento (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Charana y Yoon, 2013; Verma *et al.*, 2014; Nuncio-Orta *et al.*, 2015). En los resultados de ambos ciclos, se advierte una discrepancia del efecto de las cepas antagonistas en la protección y crecimiento de las plantas, lo que puede ser atribuido a diferencias de la presencia de factores abióticos como temperatura y humedad, que se consideran decisivos para asegurar un buen desempeño de los agentes benéficos (Akrami *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2011).

## CAPITULO III

### CEPAS DE *Trichoderma* sp. NATIVOS DE SINALOA COMO AGENTE BIOCONTROL DE LA RABIA DEL GARBANZO

#### NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* sp. OF SINALOA AS BIOCONTROL AGENTS OF RABIES CHICKPEA

Oliva Ortiz Luz del Carmen<sup>1</sup>, Velázquez Alcaraz Teresa de Jesús<sup>1</sup>, Sosa Pérez Rogelio<sup>2</sup>, Partida Ruvalcaba Leopoldo<sup>3</sup>, Díaz Valdés Tomás<sup>1</sup>, Velarde Félix Sixto<sup>4</sup>

Universidad Autónoma de Sinaloa <sup>1</sup>, Centro de Ciencias de Sinaloa <sup>2</sup>, Universidad Tecnológica de Culiacán<sup>3</sup>, INIFAP-PRODUCE, Culiacán<sup>4</sup>.

#### RESUMEN

La agricultura practicada actualmente, origina problemas de contaminación, debido al uso indiscriminado de agroquímicos, de ahí la importancia de encontrar alternativas que contribuyan a una producción agrícola sustentable, siendo una opción el empleo de microorganismos como agentes biocontrol de enfermedades. El garbanzo es un cultivo importante en Sinaloa, es afectado por la rabia del garbanzo, siendo cuyo principal agente causal es *Fusarium oxysporum*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el biocontrol de la rabia del garbanzo aplicando cepas del hongo antagónico *Trichoderma* sp nativos de Sinaloa en campo infestado por la rabia del garbanzo. Las semillas fueron inoculadas con  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma*, se establecieron cuatro tratamientos, un testigo, un fungicida químico, la cepa HRG-050 y la HRG-060 en diseño de bloques completos al azar. Mediante escalas subjetivas se evaluaron la marchitez en follaje, cáncer de raíz y vigor de planta, asimismo, se determinó altura de planta, diámetro de tallo, índice de verdor en unidades del Spad 502, peso fresco, peso seco y rendimiento. La cepa *Trichoderma* HRG-060 fue la más eficaz para controlar la rabia del garbanzo y proporcionó las mejores condiciones para un mayor desarrollo y rendimiento.

**Palabras clave:** Antagonismo, hongos, fusariosis vascular

## ABSTRACT

Agriculture currently practiced, causes pollution problems due to indiscriminate use of agrochemicals, hence the importance of finding alternatives that contribute to a sustainable agricultural production, with an option the use of microorganisms as biocontrol agents of diseases. The chickpea is an important crop in Sinaloa, is affected by rabies chickpea, the main causal agent is *Fusarium oxysporum*. The aim of this study was to evaluate the biocontrol of chickpea rabies in infective field, applying strains of antagonistic fungus *Trichoderma* sp native of Sinaloa. The seeds were inoculated with  $1 \times 10^8$  conidia mL<sup>-1</sup> of *Trichoderma*, a design with four treatments, a witness, a chemical fungicide, the HRG-050 strain and HRG-060 was established in randomized complete block. By subjective scales were evaluated wilt foliage, root cancer and plant vigor cancer. Plant height was measured, stem diameter, chlorophyll content Spad 502 units, fresh and dry weight and yield. The strain *Trichoderma* HRG-060 was the most effective in controlling rabies chickpea and provided the best conditions for further development and performance.

**Keywords:** *Antagonis, fungi, fusarium wilt*

## INTRODUCCIÓN

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). 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).

En México, el cultivo de garbanzo tiene gran importancia; a nivel mundial nuestro país es el sexto productor de este grano, con una producción de 108,799 toneladas en el ciclo 2012-2013 (FAOSTAT, 2013). En Sinaloa, este cultivo también es importante, principalmente por ser un generador de divisas, ya que casi la totalidad de su producción está destinada a la exportación principalmente a Europa y Asia, siendo nuestro Estado el principal productor y exportador de garbanzo blanco del país. La superficie sembrada en Sinaloa por esta leguminosa en 2013 fue de 79,750 ha, con una producción de 111,650 toneladas (SAGARPA, 2013).

El rendimiento del garbanzo a nivel mundial, es afectado por varias situaciones de estrés abiótico y por ataque de diferentes enfermedades, presentándose una serie de padecimientos en la raíz que se conoce como complejo de enfermedades de Marchitez y Podredumbre de Raíz (MPR) en garbanzo (Jiménez, 2011; Landa *et al.*, 2006). La fusariosis vascular del garbanzo es la enfermedad más ampliamente distribuida y severa de las que comprenden el complejo MPR, y como principales agentes causales de la fusariosis se señala a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, *Macrophomina phaseolina* entre otros (Kraft *et al.*, 1994; Bhatti y Kraft, 1992; Trapero y Jiménez, 1985).

En Sinaloa la fusariosis vascular de garbanzo es la enfermedad de mayor importancia, también se le conoce como rabia, marchitez o secadera de las plantas y su principal forma de penetración es por la raíz (Carrillo, 2010). El Género *Fusarium* es el patógeno más destacado (Gómez *et al.*, 2002), siendo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) uno de los más predominantes (Carrillo, 2010; Velarde *et al.*, 2009). El principal control de estos patógenos es mediante el empleo de químicos, los cuales en mucha ocasiones no resultan efectivos. Por otra parte, la práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura han reducido la biodiversidad del agroecosistema, ocasionando la

inestabilidad del mismo, reflejándose en una mayor incidencia y severidad de las enfermedades de las plantas (Fernández, 2007), así como el desarrollo de generaciones de patógenos más resistentes (Lazniewska *et al.*, 2012; Michel *et al.*, 2005). Lo anterior evidencia la búsqueda de agentes de control biológico como una opción factible al uso indiscriminado de pesticidas en la agricultura, desarrollándose diversas técnicas biológicas competentes que incluyen la aplicación de microorganismos antagonistas que se perfilan como alternativas a los fungicidas (Wang *et al.*, 2008).

Entre estos microorganismos antagonistas están los hongos benéficos como una opción potencial, los cuales son reconocidos como supresores naturales de fitopatógenos en los cultivos, disminuyendo la severidad de las enfermedades (Michel *et al.*, 2001; Bailey, 2011). *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). Howell (2006), 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, suministro de otros nutrientes, producción de sideróforos y de metabolitos secundarios (Chowdappa *et al.*, 2013; Akkopru y Demir, 2005; Mayak, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el biocontrol de la rabia del garbanzo aplicando cepas del hongo antagónico *Trichoderma* sp nativos de Sinaloa en campo infectado por la rabia del garbanzo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio del Centro de Ciencias de Sinaloa y en el campo experimental del INIFAP cuyas coordenadas son 24°37'49" latitud Norte y 107°26'17" latitud Oeste.

Las cepas *Trichoderma* sp. (HRG-050 y HRG-060) fueron obtenidas de la colección del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (*Foc*), fue donada por el laboratorio del Instituto Nacional de Investigación y Fomento Agrícola y Pecuario.

La activación de las cepas fue mediante la inoculación de cajas petri con medio de cultivo a base de infusión de papa, dextrosa y agar (PDA), por el método de porción. La obtención del inóculo fue por el método de la cámara de Neubauer, obteniéndose una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (Ferrón, 1981).

La siembra se realizó en diciembre del 2013, empleándose la variedad de garbanzo Blanco Sinaloa-92. La parcela experimental constó de un área de 300  $\text{m}^2$ . La densidad de siembra fue de diez plantas por metro lineal a una distancia de 10 cm entre semillas, con una separación de 0.80 m entre surcos.

Los tratamientos que se establecieron fueron: 1=Testigo; 2= Control químico (Benomilo); 3= Cepa HRG-050; y 4= Cepa HRG-060. Se estableció un diseño experimental de bloques completos al azar, con seis bloques por tratamiento.

Las variables respuesta evaluadas en laboratorio fueron: bioensayos de confrontación *in vitro* antagonistas-*Foc* raza 5, en cajas petri con medio PDA, por el método de porción, determinado en base al crecimiento radial del la cepa con respecto a *Foc* raza 5 (Quiroz *et al.*, 2008) y cinética de crecimiento, determinada en cajas petri con medio PDA, se sembraron cuatro repeticiones de las cepas y se pasaron a incubación para su observación y medición el crecimiento de los hongos durante 6 días con una temperatura de 25 °C.

En los bioensayos de confrontación *in vitro* la evaluación de la capacidad antagónica se efectuó por medio de la técnica de cultivos duales, donde se evaluaron los mecanismos antagónicos por competencia por sustrato, antibiosis y determinación del tiempo de contacto antagonista-patógeno. La competencia por sustrato se evaluó

en base a la escala de clases de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982), la cual se presenta en el Cuadro 11, y se determinó la capacidad antagónica de las cepas en base a escala propuesta por Elías y Arcos (1989), que se presenta en el Cuadro 12. El mecanismo antagónico por antibiosis fue determinado en base al porcentaje de crecimiento micelial (PIC) de acuerdo a la siguiente ecuación propuesta por Singh (2003):  $PIC = R1 - R2 / R1 \times 100$ ; donde R1= crecimiento radial del patógeno testigo y R2= crecimiento radial del patógeno en confrontación.

El tiempo de contacto fue medido en el número de días en que se unieron el patógeno y la cepa antagonista. Para determinar el efecto protector en planta de las cepas de *Trichoderma*, las variables consideradas fueron vigor de planta, marchitez de follaje y cáncer en raíz empleando escalas subjetivas (Cuadro 13), considerando porcentajes de desarrollo y flacidez de planta, clorosis y/o necrosis en planta y cáncer en raíz y tallo.

Cuadro 11. Escala de clases de antagonismo (Bell *et al.*, 1982).

Clase	Crecimiento
Clase 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio del cultivo.
Clase 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio del cultivo.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio del cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes de la superficie del medio del cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio del cultivo.

Cuadro 12. Escala de la capacidad antagónica (Elías y Aros, 1989)

Grado	Capacidad antagónica
Grado 0	Ninguna invasión sobre la superficie de la colonia del hongo patógeno
Grado 1	Invasión de un cuarto de la superficie de la colonia del hongo patógeno
Grado 2	Invasión de la mitad de la superficie de la colonia del hongo patógeno
Grado 3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
Grado 4	Invasión total y esporulación sobre la colonia del hongo patógeno

Cuadro 13. Escala subjetiva para evaluar el efecto protector de las cepas de *Trichoderma* en plantas de garbanzo.

Escala	Vigor de planta	Marchitez de follaje	Cáncer en raíz
1	0% Menos vigor	No marchitez en follaje	No cáncer
2	25% Ligeramente	25 % de áreas del follaje enfermas	25% del área de raíces enfermas
3	50% Medio	50% del área del follaje enfermas	50% del área de raíces enfermas
4	75% Vigorosa	75% del follaje enfermo	75% de las raíces enfermas
5	100% más vigorosa	Follaje totalmente enfermo	Raíces completamente enfermas

Para determinar el efecto de la estimulación del desarrollo las variables consideradas fueron altura de planta (cm), diámetro de tallo (mm), índice de verdor (unidades SPAD), peso fresco (g), peso seco (g) y rendimiento (g planta<sup>-1</sup>).

Para la evaluación estadística se consideraron los valores obtenidos de las variables de respuesta con respectivas réplicas por tratamiento, se sometieron al análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey P<0.05), en el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los bioensayos de confrontación *in vitro* antagonistas-*Foc* raza 5 mediante cultivos duales, se presentaron diferencias significativas del crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sp. con respecto a *Foc* raza 5. Al tercer día de observación la cepa HRG-050 creció en un 76% y *Foc* creció en un 24%, registrándose incremento en el crecimiento de HRG-050 del 69% y de *Foc* en un 85% con respecto al primer día. La cepa HRG-060 aumentó en un 82% al tercer día de observación, y el crecimiento de *Foc* (18%) no aumentó. Al cuarto día de observación, la cepa HRG-060 cubrió completamente la superficie de la placa, encimándose sobre *Foc* (Figura 4).

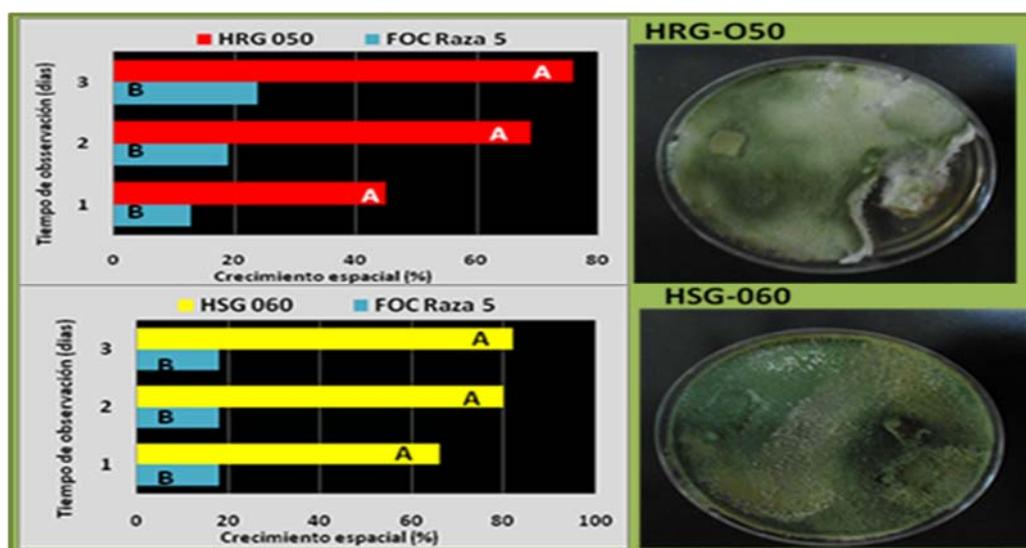


Figura 4. Bioensayos de confrontación *in vitro* antagonistas-*Foc* raza 5.

En base a las observaciones realizadas en las confrontaciones *in vitro* al tercer día después de la siembra del cultivo dual, se determinó que el mecanismo antagónico por competencia por el sustrato de la cepa HRG-060 se ubica en la Clase 1; la cepa HRG-050 presentó un antagonismo Clase 2. Sin embargo, al quinto día de observación, ambas cepas reportaron un antagonismo Clase 1. La capacidad antagónica de ambas cepas al séptimo día de estudio en base a la escala de Elías y Aros (1989), fue del Grado 4, tanto la cepa HRG-060 como HRG-050 esporularon sobre la superficie de *Foc* raza 5 (Figura 4 y Figura 5).

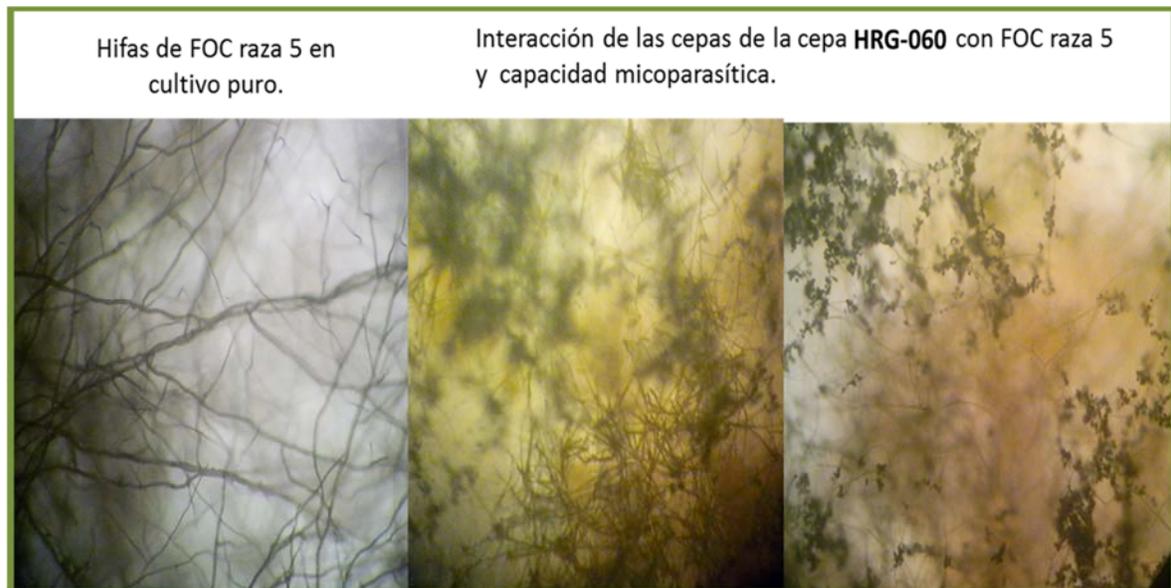


Figura 5. Mecanismos antagónicos por competencia por el sustrato.

En la determinación del mecanismo antagónico por antibiosis se encontró que el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIC) fue de un 80% para la cepa HRG-060 y un PIC de 76% para la cepa HRG-050.

En la evaluación del tiempo de contacto antagonista-patógeno se observaron diferentes resultados. La unión entre la cepa HRG-060 y *Foc* se efectuó a los dos días después de la siembra y el contacto entre la cepa HRG-050 y *Foc* se consumó al tercer día, resultados que se observan en la Figura 6.

La evaluación de la variable cinética de crecimiento se presenta en la Figura 7. Se observa que la mayor velocidad de crecimiento se presentó en la cepa HRG-060 y *Foc* mostró un crecimiento lento con respecto a ambas cepas de *Trichoderma*. En el primer día de lectura, el crecimiento espacial con respecto a *Foc* fue superior en un 130 y 39% de HRG-060 y HRG-050 respectivamente; en el segundo día el crecimiento espacial fue superior en un 216 y 152% de HRG-060 y HRG-050 mutuamente; al tercer día de observación, el crecimiento de ambas cepas de *Trichoderma* con respecto a *Foc* fue de 349%. En la Figura 8 se muestra el crecimiento radial final de los antagonistas y del fitopatógeno.

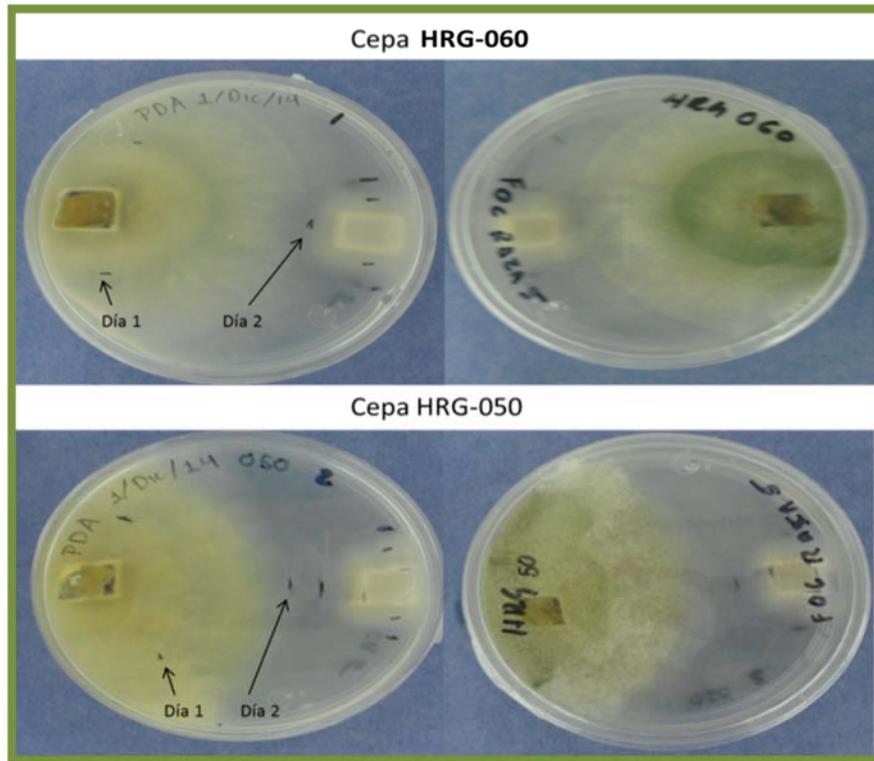


Figura 6. Tiempo de contacto antagonista-patógeno

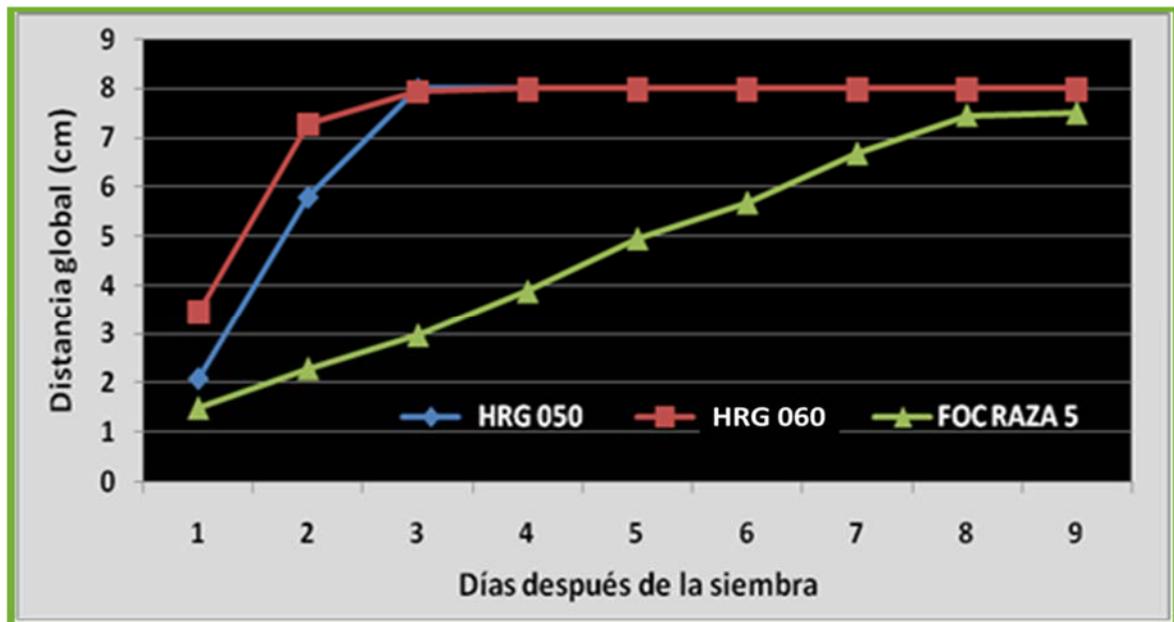


Figura 7. Cinética de crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sp. HRG-050, HRG-060 y *Foc*.

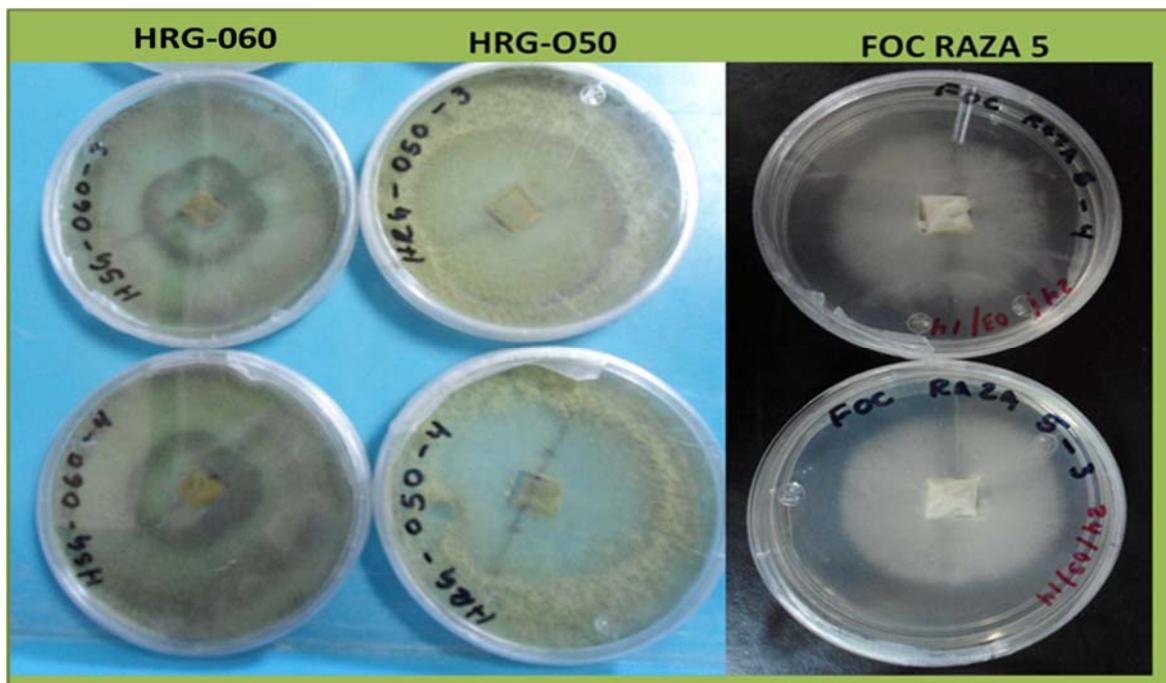


Figura 8. Crecimiento radial final de las cepas de *Trichoderma* sp. y *Foc* raza 5.

Se evaluaron las variables que mostraron el efecto protector de las cepas fúngicas (Cuadro 14). Los resultados obtenidos en los análisis estadísticos en la prueba de Kruskal-Wallis, un valor de  $P < 0.05$  indica que en los tratamientos se encontraron diferencias significativas. Las plantas inoculadas con la cepa HRG-060 (T4) presentaron valores estadísticamente diferentes en las variables vigor de planta, marchitez del follaje y cáncer oscuro en raíz y tallo. El promedio de vigor de T4 fue superior en un 36% al valor del testigo. La marchitez del follaje en las plantas del T4, fue inferior en un 17% con respecto a las plantas del T1. La variable cáncer de raíz, en las plantas del T4 fue menor en un 24% con respecto al testigo (Cuadro 14).

Los resultados de la evaluación de las variables mediante las que se determinó el efecto de la estimulación del desarrollo se presentan en el Cuadro 15. En altura de planta se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, el mayor valor se presentó en las plantas del T4 y la menor altura en las plantas del T2. En el diámetro de tallo también se reportan diferencias significativas, el mayor valor se presentó en las plantas del T4, siendo un 12% mayor al obtenido por las plantas del T1; el menor diámetro lo obtuvieron las plantas del T2. En verdor de planta, no se

presentaron diferencias estadísticas, sin embargo, el mayor valor se presentó en las plantas del T4, siendo un 4% superior al obtenido por las plantas del T1; el menor valor se presentó en las plantas del T3. En el peso fresco se reportan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, el peso fresco de las plantas de T4 fue significativamente mayor al obtenido por las plantas del resto de los tratamientos, siendo un 57% superior al obtenido por las plantas del T1. Al analizar el peso seco, no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, pero sí numéricas; el mayor promedio se obtuvo en las plantas del T4, siendo un 21% mayor al obtenido por las plantas del T1. En rendimiento, se reportan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, el mayor rendimiento promedio lo obtuvieron las plantas del T4, siendo 156% mayor al obtenido por T1; el menor valor promedio se presentó en las plantas del T2.

Cuadro 14. Respuesta de la inoculación de semillas con cepas de *Trichoderma* sp. y fungicida químico al vigor, marchitez en follaje y cáncer en raíz y tallo en plantas de garbanzo cultivadas en campo.

Tratamiento	Vigor	Marchitez en follaje	Cáncer en raíz
T1=Testigo	1.61 b*	4.02 ab	4.05 a
T2=Fungicida	1.8 b	3.95 b	3.72 ab
T3=HRG-050	1.4 b	4.57 a	4.14 a
T4=HRG-060	2.19 a	3.32 c	3.07 b

\*Medias entre columnas seguidas con una misma letra son estadísticamente iguales entre sí (P< 0.05).

Suárez *et al.* (2007), mencionan que entre los principales microorganismos antagonistas del suelo se encuentran aislados de géneros de hongos como: *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*, los resultados de esta investigación lo corroboran, ya que en base a los ensayos de antagonismos *in vitro*, se demuestra que las cepas de *Trichoderma* son antagonistas a la raza 5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, porque redujeron en forma apreciable el desarrollo del patógeno y esporularon abundantemente sobre la superficie de la colonia, resultados similares a los obtenidos por Elías *et al.* (1989). El antagonismo presentado por la cepa HRG-

060 se debe en parte a la mayor tasa de crecimiento y a la mayor capacidad de colonización del sustrato, en comparación al patógeno, como se demostró con la prueba de cinética de crecimiento; estos resultados coinciden a los obtenidos por Michel *et al.* (2001), quienes reportan que cepas de *Trichoderma* inhiben la formación de conidios de *Fusarium oxysporum* en más del 60%, reduciendo su potencial reproductivo, e inhibición del crecimiento en su micelio por el mecanismo de antibiosis en un rango de 1-47%. Por otra parte, *Trichoderma* HRG-050, presentó un menor antagonismo sobre el patógeno; esta variación entre los aislados coincide con lo observado por Calistrus *et al.* (1997), quienes reportan conductas antagonistas diferentes entre una misma especie.

Cuadro 15. Respuesta de la inoculación de semillas con cepas de *Trichoderma* sp. y fungicida químico al crecimiento, desarrollo y rendimiento en plantas de garbanzo cultivadas en campo.

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Verdor (SPAD)	Peso	Peso	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )
				fresco (g)	seco (g)	
T1=Testigo	27.96 a*	4.71 ab	45.74 a	19.89 b	15.5 a	10 b
T2=Fungicida	23.48 b	4.58 b	42.34 a	17.86 b	17.33 a	4.4 b
T3=HRG-050	25.01 ab	4.92 ab	40.91 a	17.19 b	13.64 a	4.9 b
T4=HRG-060	28.11 a	5.27 a	47.5 a	31.24 a	18.79 a	25.6 a

\*Medias entre columnas seguidas con una misma letra son estadísticamente iguales entre sí (P< 0.05).

Calvo *et al.* (2012), Martínez *et al.* (2008), y Arzate *et al.* (2006), reportan que más del 85% de las cepas de *Trichoderma* sp. confrontadas con fitopatógenos, al evaluar el mecanismo antagónico por competencia por el sustrato, son ubicadas en la Clase 1 y Clase 2, coincidiendo con lo reportado en esta investigación.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* HRG-060 Y HRG-050 de 80 y 76% respectivamente, difieren a los reportados por Michel *et al.* (2005), quienes al confrontar cepas de *Trichoderma* con otros fitopatógenos encontraron valores de PIC superiores al 90%. Los resultados del

tiempo de contacto obtenidos, coinciden con lo reportado por Calvo *et al.* (2012), Arzate *et al.* (2006), quienes señalan que el contacto entre *Trichoderma* y diversos patógenos se efectúa entre uno y tres días después de la siembra. Michel *et al.* (2001), sostienen que una característica importante para considerar a un posible antagonista es su agresividad, la cual es determinada en gran parte al corto tiempo de contacto.

Los resultados de ésta investigación señalan que la cepa HRG-060 protege a las plantas de la rabia del garbanzo, debido a que la inoculación de las semillas de garbanzo por esta cepa aminoró la marchitez del follaje y cáncer de raíz e incrementó el vigor de planta, por lo anterior se deduce que estos organismos, incrementaron sus poblaciones, sobrevivieron, colonizaron las raíces y tuvieron éxito en la protección del cultivo con respecto al patógeno, tal como lo refieren Kim *et al.* (1997). Estos resultados también coinciden con Druzhinina *et al.* (2011), y Hoyos (2009), quien señala que *Trichoderma* sp. es un hongo que funciona como biocontrol de *F. oxysporum* en diversos cultivos, y con Kaur y Muthamilan (1992), quienes observaron que *Trichoderma* sp. controló eficazmente al complejo de hongos causantes de la marchitez del garbanzo, incluido *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*.

El efecto estimulador presentado por las plantas de garbanzo al utilizarse *Trichoderma* coincide por lo reportado por Moradi (2013), Hermosa *et al.* (2000), y Bailey y Lumsden (1998), ya que ellos indican que la inoculación de semillas con *Trichoderma* induce a la producción de hormonas de crecimiento, produce enzimas y mejora la transferencia de minerales desde el suelo a la raíz. En general se puede señalar que los resultados de la cepa HRG-060 son debidos a que estos organismos interactúa antagónicamente con patógenos mediante la competencia por nutrientes, genera metabolitos secundarios con efecto antibiótico o parasitando directamente a los patógenos, además mejora el crecimiento de las plantas y genera resistencia a condiciones de estrés, tal como lo señalan Alizadeh (2013), Cano (2011), y Hermosa *et al.* (2000).

## CAPITULO IV

### MORFOLÓGÍA Y BIOQUÍMICA DE ANTAGONISTAS MICROBIANOS Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE GARBANZO Y CONTROL DE FUSARIOSIS

Luz del Carmen Oliva Ortiz<sup>1</sup>, Teresa de Jesús Velázquez Alcaraz<sup>1</sup>, Rogelio Sosa Pérez<sup>2</sup>, Leopoldo Partida Ruvalcaba<sup>3\*</sup>, Tomás Díaz Valdes<sup>1</sup>, Julio Arciniega Ramos<sup>1</sup>, Jacobo Enrique Cruz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán de Rosales, México

<sup>2</sup>Centron de Ciencias de Sinaloa, Culiacán de Rosales, México

<sup>3</sup>Universidad Tecnológica de Culiacán, Culiacán de Rosales, México

Email: [\\*parpolo@yahoo.com.mx](mailto:*parpolo@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es un cultivo de gran importancia en el mundo, cuya producción es afectada por la fusariosis vascular. El objetivo de este estudio, fue caracterizar morfológica y bioquímicamente, seis microorganismos rizosféricos autóctonos del centro de Sinaloa (T442, T3241, 7A1, 751, HRG-050 y HRG-060), pertenecientes al Cepario del Centro de Ciencias de Sinaloa, mediante catálogos y pruebas API, y determinar su efecto en la protección contra la fusariosis vascular, y en la estimulación del crecimiento y rendimiento de garbanzo bajo condiciones de campo. Estudios preliminares se efectuaron *in vitro*, evaluando el antagonismo mediante el PICR de cada antagonista contra *Foc*, en cultivo dual, en placas Petri, con medio de cultivo PDA; y se evaluó la estimulación de germinación mediante inoculación de semillas con cada uno de los antagonistas. En campo, las semillas de garbanzo fueron inoculadas con las cepas antagonistas a una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc o conidios mL<sup>-1</sup>, estableciéndose ocho tratamientos: seis a base de inoculación de semilla con cada antagonista, un tratamiento químico (Benomilo) y un testigo, en un diseño de bloques completos al azar, evaluándose el efecto protector y estimulador en las plantas de garbanzo. Las cepas fueron caracterizadas como *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp. y *Bacillus megaterium* con bajo porcentaje de confiabilidad. HRG-060 (*Trichoderma* sp.) y T442 (*Bacillus subtilis*) mostraron ser los mejores agentes biocontrol en

laboratorio y campo, así como los mayores promotores del crecimiento, pues redujeron significativamente el crecimiento del patógeno y la incidencia de la enfermedad en campo, e incrementaron la germinación, verdor, biomasa y rendimiento del garbanzo. El uso de las cepas HRG-060 y T442, para el control de la fusariosis vascular del garbanzo es posible en las condiciones presentes en la zona centro de Sinaloa.

### ABSTRACT

The chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an important crop in the world. In this study, six strains of indigenous rhizosphere microorganisms (T442, T3241, 7A1, 751, HRG-050 y HRG-060), were characterized morphologically and biochemically through catalogs and API tests, and evaluated as growth promoters and biocontrol agents of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*), causal agent of Fusarium wilt of chickpea under laboratory and field conditions. Preliminary studies were performed *in vitro*, evaluating antagonism by PICR of *Foc*, in Petri dishes with PDA culture medium; the stimulation of germination was evaluated by seed inoculation with the same strains. In the field, chickpea seeds were inoculated with said antagonistic strains at a concentration of  $1 \times 10^8$  ufc or conidia mL<sup>-1</sup>, establishing eight treatments: six based on the inoculation of seed with each antagonist strain, a chemical treatment (Benomyl) and a witness, in block design randomized complete, evaluating the protective effect and stimulatory in chickpea plants. The strains were characterized as *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas* sp., *Trichoderma* sp., and *Bacillus megaterium*, the latter with low percentage of identification. HRG-060 (*Trichoderma* sp.) and T442 (*Bacillus subtilis*) proved to be the best biocontrol agents in laboratory and field, as well as higher growth promoters, as significantly reduced growth of the pathogen and the incidence of the disease in the field, and increased the germination, greenness, biomass and yield of chickpea. The use of strains HRG-060 y T442 to control Fusarium wilt of chickpea may be possible in the conditions that have the central area of Sinaloa.

Keywords: *Trichoderma*, *Bacillus*, *Fusarium oxysporum ciceris* race 5, native strains.

## INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.), es un cultivo de gran importancia en la alimentación mundial, debido a principalmente a su alto contenido de proteína (Jukanti *et al.*, 2012); siendo la segunda leguminosa más importante del mundo después del frijol (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Su principal productor y consumidor es la India, con una cosecha de 9,356,250 t en el ciclo 2013-2014, ocupando México el octavo lugar de producción, al aportar 190,803 t en ese mismo ciclo (FAOSTAT, 2015); llevándose a cabo su producción principalmente en la zona Noroeste del país, que comprende a Sinaloa y Sonora (Guerrero *et al.*, 2015), siendo Sinaloa el principal productor y exportador de garbanzo (SIAP, 2015). La fusariosis vascular es la enfermedad más importante que afecta al garbanzo en todo el mundo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015), la cual reduce su rendimiento (Navas-Cortés *et al.*, 2000), y ha sido reportada en la mayoría de las zonas donde se cultiva garbanzo (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015). Uno de los principales agentes causales de esta enfermedad es *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) (Demers *et al.*, 2014); en el centro de Sinaloa se ha reportado a *Foc* raza 5 como el principal patógeno (Velarde *et al.*, 2015). En los últimos años, las pérdidas debidas a la fusariosis vascular han variado del 10-70%, significando reducciones de exportación, incremento de costos de producción y disminución de la rentabilidad (Guerrero *et al.*, 2015). El uso de fungicidas en el tratamiento a la semilla es una forma de reducir esta enfermedad (Ávila *et al.*, 2015); sin embargo, ningún tratamiento químico ha proporcionado un nivel de control satisfactorio (Karimi *et al.*, 2012). Además, estos compuestos producen efectos negativos en el medio ambiente, pues contaminan el suelo, agua y aire, generando residuos tóxicos, además de inducir generaciones de fitopatógenos resistentes, alterando el equilibrio ecológico (Moradi *et al.*, 2012; Naher *et al.*, 2014). Debido a los resultados adversos que producen los pesticidas, la tendencia en la agricultura es la utilización de insumos de bajo impacto ambiental y sin problemas de toxicidad (Pastrana *et al.*, 2016); situando así al control biológico como una alternativa dentro del manejo de enfermedades (Abdulkareem, 2014).

Numerosos estudios se han realizado con diversos microorganismos rizosféricos para el biocontrol de *F. oxysporum* (Hernández *et al.*, 2014; Eshetu *et al.*, 2015); identificándose algunos antagonistas con efecto de supresión en *Foc* y que mejoran el crecimiento del garbanzo como bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como hongos del género *Trichoderma* (Karimi *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2012). Cuyos principales mecanismos de control biológico son la competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, parasitismo, producción de compuestos inhibidores e inducción de resistencia sistémica en la planta (Infante *et al.*, 2009; Melnick *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2014). La antibiosis de *Trichoderma* es por producción de sustancias como tricodermina, tricodermol, tricotoxina, dermadina (Vinale *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2013); mientras que *Bacillus* y *Pseudomonas* producen metabolitos antifúngicos como: iturinas, bacitracina, bacillin, subtenolin, ácido cianhídrico, entre otros (Eshetu *et al.*, 2015; Ruiz *et al.*, 2014). El parasitismo de estos tres agentes biocontrol, es inducido por la producción de enzimas de degradación de la pared celular, como: celulasas, quitinasas, glucanasas y proteasas (Bhattacharyya *et al.*, 2012; Singh y Singh, 2013). Asimismo, estos organismos son considerados como promotores del crecimiento vegetal y contribuyen a la producción de sustancias como fitohormonas, metabolitos secundarios, fitoalexinas y sideróforos (Infante *et al.*, 2009; Bhattacharyya *et al.*, 2012; Singh y Singh, 2013); pueden favorecer el crecimiento de la planta por medio de la fijación de nitrógeno, solubilización y absorción de fósforo y otros nutrientes, incrementan el desarrollo de la raíz, estimulan la germinación, emergencia de plántulas e incrementan la tolerancia al estrés (Infante *et al.*, 2009; Cano *et al.*, 2011; Bhattacharyya *et al.*, 2012; Singh y Singh, 2013).

Asimismo, es tema de interés, el estudio de antagonistas autóctonos, pues el principal problema en la efectividad de biocontrol de patógenos, es la introducción de organismos no nativos en los ecosistemas, ya que no se encuentran adaptados a las condiciones ambientales donde se van a aplicar (Calvo *et al.*, 2012), señalándose que el empleo de cepas comerciales pudiera generar competencia o inhibición contra los organismos, o simplemente no prosperar su propagación dentro de la microbiota del suelo (Robinson-Boyera *et al.*, 2009).

Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar morfológica y bioquímicamente a seis microorganismos autóctonos previamente aislados de raíces de plantas de garbanzo, cultivado en suelos con problemas de fusariosis vascular ubicados en la parte central de Sinaloa; determinar en condiciones de laboratorio y campo su potencial antagonista contra *Foc* raza 5, principal agente causal de la enfermedad; así como estimar su efecto como promotores de crecimiento y rendimiento en garbanzo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización geográfica**

La investigación se realizó en el campo experimental del Instituto Nacional de Investigación y Fomento Agrícola y Pecuario (INIFAP-Culiacán), con coordenadas geográficas de 24°37'49" latitud Norte y 107°26'17" longitud Oeste, así como en el laboratorio del Centro de Ciencias de Sinaloa. La parcela experimental correspondía a un predio infestado fuertemente desde hace varios años por fusariosis vascular del garbanzo, en la cual se realizó un muestreo en forma al azar y un análisis de fertilidad del suelo, cuyas características se presentan en el Cuadro 16, observándose que es un suelo de textura arcillosa, de pH neutro, sin problemas de sales y bajo contenido de materia orgánica, con capacidad de intercambio catiónico media, altas concentraciones de calcio y magnesio, contenido medio de potasio y niveles bajos de nitratos, fósforo y azufre. Las concentraciones de los nutrientes solubles e intercambiables son bajas a excepción del calcio y magnesio, cuya concentración es alta y adecuada respectivamente.

### **Activación y caracterización de las cepas antagonistas microbianas**

Se realizaron ensayos *in vitro* y en campo con seis microorganismos antagonistas autóctonos del centro de Sinaloa, México; cuatro bacterias (T442, T3141, 751, 7A1) y dos hongos (HRG-050 y HRG-060) del cepario del Centro de Ciencias de Sinaloa, aislados previamente a partir de suelo rizosférico de plantas de garbanzo con síntomas de fusariosis. Para evaluar el antagonismo *in vitro* de estas cepas, se empleó una cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, principal agente de la

fusariosis del garbanzo en esta zona, perteneciente a la colección del INIFAP, identificada molecularmente e ingresada al GeneBank como KJ000584-raza 5 (Velarde *et al.*, 2013).

Cuadro 16. Análisis de fertilidad del suelo de la parcela experimental.

Análisis		Resultados	
Textura		15% arena, 16% limo, 69% arcilla	
pH		7.1	
CE		1.76 dSm <sup>-1</sup>	
Materia orgánica		1.12 %	
CIC		22.43 meq 100 g suelo	
Contenido nutrimental total (ppm)		Nutrientes solubles (meq L <sup>-1</sup> )	
N-NO <sub>3</sub> total	13.7	NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	0.89
P total	4.8	P-PO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0.02
S total	5.0	S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0.63
K intercambiable	332.0	K <sup>+</sup>	0.41
Ca intercambiable	3,346.0	Ca <sup>+2</sup>	8.86
Mg intercambiable	425.0	Mg <sup>+2</sup>	2.45
Na intercambiable	320.0	Na <sup>+</sup>	5.85

Las cepas fueron activadas mediante la inoculación de cajas Petri con medio de cultivo a base de agar nutritivo (AN) y agar FLO (AF) para las bacterias por el método de asada gruesa; y las cepas fúngicas en medio agar papa dextrosa (PDA), por el método de porción y fueron incubados a 28 °C durante 48 h en el caso de las bacterias y por cinco días en los hongos, en una incubadora de mesa Thermo Scientific, Modelo BK6160. En principio, las cepas fueron sometidas a una distinción morfológica colonial (Agurto, 1989), para ello se sembraron por medio de asada, en cajas Petri con medio de cultivo de AN y AF para las bacterias y en PDA las cepas fúngicas, siendo incubadas a 28°C por 48 y 72 horas respectivamente. En las cepas bacterianas, se determinaron las características microscópicas, considerando tinción Gram y presencia de esporas mediante la técnica de Schaeffer-Fulton (Garassini,

1967); para la identificación mediante su conducta bioquímica se empleó el sistema de diagnóstico API BioMérieux 50CHB V4.0 complementado con 20NE V7.0; para ello, se hicieron inóculos con material biológico fresco, el cual fue suspendido en solución salina y con ello se llenaron las galerías de los API y fueron incubadas a 33 °C por 24 y 48 horas, observándose posteriormente los colores de las reacciones producidas; una vez obtenidos los perfiles, estos fueron identificados utilizando la base de datos de BioMérieux, empleada en estos ensayos. Para la identificación de las cepas fúngicas se tomaron en cuenta características morfológicas de sus estructuras macroscópicas (color de micelio, forma de micelio y crecimiento) y microscópicas (hifas, conidios, clamidospora), considerando las claves taxonómicas de Ainsworth (Kirk y Ainsworth, 2008).

### **Confrontación *in vitro***

Se realizaron bioensayos *in vitro* para determinar el efecto antagónico de las cepas, por medio de la técnica de cultivo dual (Ezziymani *et al.*, 2004), en cajas Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo PDA (15 mL); un disco de 5 mm de diámetro del micelio del fitopatógeno con previo crecimiento (6 días) en PDA, debido a las diferencias en sus tasas de crecimiento, fue sembrado a un cm de la orilla de la placa y fueron incubados a 28 °C; tres días después, se sembró por el método de asada gruesa al centro de la caja, cada uno de los antagonistas bacterianos (Estrella *et al.*, 2001); los antagonistas fúngicos fueron sembrados por el método de porción, al otro extremo de la caja, mediante discos del mismo diámetro que el patógeno, tomados de la parte con esporulación de la colonia del antagonista (Ezziymani *et al.*, 2004). Además se contó con un testigo absoluto, en caja Petri con medio PDA, se colocó a un cm del borde un disco de 5 mm de diámetro del micelio del patógeno. Se realizaron cuatro replicas por cada cepa. Las placas se incubaron a 28 °C por 15 días. El crecimiento radial de las colonias de antagonistas y fitopatógeno se midió cada 24 h, realizando las observaciones hasta los diez de post-incubación.

La capacidad antagónica por antibiosis de las cepas ensayadas fue evaluada a los siete días de post-inoculación, mediante el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), empleando la fórmula propuesta por Ko *et al.* (2009),  $PICR = [(R1 -$

$R2)/100$ ]; donde, PICR es el porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio del fitopatógeno; R1 es el crecimiento de la colonia del patógeno-testigo; y R2 es el crecimiento radial de la colonia del patógeno en confrontación en cultivo dual. Los datos se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar.

### **Preparación del inóculo de las cepas antagonistas**

Matraces de 500 mL con medio nutritivo a base de caldo nutritivo y caldo soya triptocaseína para bacterias y PDA para los hongos fueron inoculados con cada cepa. Mediante un asa, se tomó una muestra de cada antagonista, previamente activado y purificado, colocándose en los matraces con los medios correspondientes; una vez inoculados, se pasaron a una incubadora a 28 °C con agitación 150 RPM, durante una semana, para obtener la biomasa, que fue cosechada por medio de una centrifuga Sigma 3-18P (20 minutos a 3800 RPM), a temperatura ambiente.

Las bacterias se cuantificaron por la técnica de diluciones seriadas en tubos con solución salina estéril al 0.85%, y por conteo de colonias en placa, empleando la escala de McFarland, con turbiedad igual al estándar 0.5 (Ortigoza y Ruiloba, 1998), para obtener una suspensión con una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>. La concentración de esporas fúngicas se estimó utilizando una cámara de Neubauer, para una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup> (Ferrón, 1981). Con este inóculo se impregnaron semillas de garbanzo para efectuar la prueba de germinación de semillas y para la siembra en el ensayo de campo.

### **Germinación de semillas en laboratorio**

Con cada cepa antagonista (T442, T3141, 751, 7A1, HRG-050 y HRG-060), fueron inoculadas 40 semillas de garbanzo, colocándose diez semillas por caja Petri, además, se contó con un testigo absoluto, donde a las semilla solo se les aplicó agua, por tanto fueron siete tratamientos, conformados con cuatro repeticiones; la unidad experimental consistió en una caja Petri. Una vez inoculadas las semillas, se pusieron en un cuarto oscuro, a temperatura ambiente, para observar la germinación. Los datos fueron analizados mediante un diseño experimental completamente al azar.

## **Ensayo en campo**

El trabajo se llevó a cabo en el ciclo 2013-2014, la siembra se efectuó en diciembre de 2013, empleándose semillas de garbanzo variedad Blanco Sinaloa 92. La preparación del terreno fue en base a un doble rastreo. Cada tratamiento se aplicó en seis surcos de ocho m de largo. La densidad de siembra fue de doce plantas por metro lineal a una distancia de 10 cm entre semillas, con una separación de 0.80 m entre surcos y una profundidad de siembra de 10 cm. Para la fertilización se aplicaron los siguientes productos: nitrato de potasio, nitrato de calcio, sulfato de magnesio, fosfato monopotásico en dosis de 10, 10, 4 y 2 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente. Se aplicó un riego de auxilio a los 20 días después de la siembra.

### **Tratamientos y diseño experimental en campo**

Se establecieron en base a la inoculación de semillas de garbanzo con las cepas autóctonas T442, T3141, 7A1, 751, HRG-050 y HRG-060, un fungicida químico y el testigo. Distribuyéndose de la siguiente manera: T1= Testigo (sin inóculo); T2= Benomilo (químico); T3= 7A1; T4= T442; T5= 751; T6= T3141; T7= HRG-050; y T8= HRG-060.

Se estableció un diseño experimental de bloques completos al azar, con ocho tratamientos y seis bloques por tratamiento. En cada bloque se escogieron diez plantas para evaluar el efecto protector y estimulador del crecimiento de los tratamientos. Para determinar el efecto protector de los antagonistas, se empleó escala subjetiva, con valores de 1 a 5 para evaluar las variables vigor de planta (donde 1 representaba 0% de vigor y 5 significaba 100% de vigor, considerando desarrollo y flacidez de la planta); marchitez de follaje y cáncer oscuro en raíz (donde 1 era el 0% de clorosis en el follaje y 0% de cáncer en raíz, y 5 era el 100% de follaje totalmente marchito y 100% de raíces con cáncer oscuro). Para determinar el efecto de la estimulación del crecimiento y rendimiento, las variables consideradas fueron: altura de planta (cm), empleando cinta metálica, desde la base del tallo hasta la parte más alta de la planta; diámetro de tallo (mm), empleando un vernier digital, a un cm de la base del tallo; verdor de planta, en unidades del medidor SPAD, evaluado

mediante un SPAD 502, marca Spectrum Technologies, Inc.; peso fresco y peso seco de planta (g); rendimiento, en g planta<sup>-1</sup>, colectándose las bolsas y sacando las semillas de cada planta evaluada, para posteriormente pesarlas en una balanza digital.

### **Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos se sometieron a un ANOVA, después de comprobarse su normalidad y homogeneidad, en las variables que presentaron diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (P<0.05) en SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Caracterización de las cepas antagonistas**

En el Cuadro 17, se indica la descripción morfológica de las cepas, según el Manual de Bergey's, Palleroni (2005). En base a las características presentadas, se pudo otorgar una previa distinción, para posteriormente aplicar las pruebas bioquímicas, Larrea *et al.* (2015); las colonias de T442 y T3141 se ubicaron previamente dentro del género de *Bacillus* por su forma irregular, color crema y apariencia de los bordes, Sosa *et al.* (2011); 7A1 y 751 se clasificaron como *Pseudomonas*, (Palleroni, 2005); y las cepas fúngicas se identificaron dentro del género *Trichoderma* (Kirk y Ainsworth, 2008).

Con la prueba de tinción de Gram se logró conocer que las cepas T442 y T3141 mostraron tinción violeta, indicando ser células Gram positivas, además presentaron forma bacilar y presencia de endosporas; 7A1 y 751 presentaron tinción Gram negativa, con forma de bacilos ligeramente curvados y sin presencia de esporas, lo que a su vez permitió corroborar que corresponden a *Bacillus* y *Pseudomonas*, respectivamente, según el Manual de Bergey's, Palleroni (2005); resultados que son similares a los encontrados por Larrea *et al.* (2015), para determinar el género *Bacillus*, así como por Álvarez *et al.* (2014), quienes mediante esta prueba identificaron a los microorganismos empleados como *Pseudomonas*.

Cuadro 17. Descripción de la morfología colonial de las cepas bacterianas y fúngicas.

Característica	T442	T3141	7A1	751	HRG-050	HRG-060
Diámetro colonial	2 mm	3 mm	2 mm	3 mm	12 mm	18 mm
Forma	Irregular	Irregular	Circular	Irregular	circular	circular
Borde	Ligeramente lobulado	Liso	Dentado	Liso	Filamentoso	Filamentoso
Superficie	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lascinada	Lascinada
Consistencia	Butirosa	Mucosa	Húmeda	Butirosa	Seca	Seca
Color	Crema	Blanquecina	Crema Amarillo	Blanca	Verde	Verde
Color UV	---	---	verdoso	Cremoso	----	----
Olor	Ácido láctico	Ácido láctico	Ácido láctico	Heces	Tierra húmeda	Tierra húmeda
Brillo	Opaco	Brillante	Brillante	Opaco	Opaco	Opaco
Paso de luz	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate
Elevación	Plana	Ligeramente convexa	Ligeramente Convexa	Plana	Papilada	Papilada

### Identificación de las cepas bacterianas mediante su conducta bioquímica

La caracterización bioquímica de las bacterias se presenta en el Cuadro 18, en donde se puede observar que las cepas T3131 y T442 solo difirieron en tres pruebas: Galactoxa, N-Acetil Glucosamina y Gentobiosa, siendo negativas para T3141 y positivas para T442. Mientras que en las cepas 751 y 7A1, las diferencias se presentaron en las pruebas de Hidrólisis de la Gelatina, asimilación de Ácido Cáprico, Ácido Adípico, Citrato y Ácido Fenil Acético; en la primera, la reacción fue negativa para 7A1 y positiva para 751, con las otras cuatro pruebas, 7A1 presentó reacciones positivas y las de 751 fueron negativa.

Los análisis de perfil bioquímico aportados por la base de datos APILAB del test API 50 CHB y API 20 NE, ayudan a caracterizar la fisiología de estas bacterias, de manera fácil y rápida (Gacitúa *et al.*, 2009); considerándose muy útiles para la identificación hasta el nivel de especie por su elevada precisión. Además de la observación de morfología y esporulación, la respuesta a la tinción de Gram, permiten, ubicarlos dentro de su género (Sosa *et al.*, 2011; Álvarez *et al.*, 2014). Mediante el empleo de los sistemas API, los microorganismos pudieron ser ubicados

con un alto porcentaje de identificación; aunque para la cepa T3141 dicho porcentaje fue bajo (Cuadro 19).

Cuadro 18. Pruebas bioquímicas de las cepas bacterianas antagonistas.

API 50 CHB	Cepa		API 50 CHB	Cepa		API 20 NE	Cepa	
Reacción	T3141	T442	Reacción	T3141	T442	Reacción	7A1	751
0	-	-	ESC	+	+	NO3	+	+
GLY	+	+	SAL	+	+	TRP	-	-
ERY	-	-	CEL	+	+	GLU	-	-
DARA	-	-	MAL	+	+	ADH	-	-
LARA	+	+	LAC	+	+	URE	+	+
RIB	+	+	MEL	+	+	ESC	+	+
DXYL	+	+	SAC	+	+	GEL	-	+
LXYL	-	-	TRE	+	+	PNG	+	+
ADO	-	-	INU	-	-	GLU	+	+
MDX	-	-	MLZ	-	-	ARA	+	+
GAL	-	+	RAF	+	+	MNE	+	+
GLU	+	+	AMD	+	+	MAN	+	+
FRU	+	+	GLYG	+	+	NAG	+	+
MNE	+	+	XLT	-	-	MAL	+	+
SBE	-	-	GEN	-	+	GNT	+	+
RHA	-	-	TUR	-	-	CAP	+	-
DUL	-	-	LYX	-	-	ADI	+	-
INO	+	+	TAG	-	-	MLT	+	+
MAN	+	+	DFUC	-	-	CIT	+	-
SOR	+	+	LFUC	-	-	PAC	+	-
MDM	-	-	DARL	-	-	OX	+	+
MDG	+	+	LAPL	-	-			
NAG	-	+	GNT	-	-			
AMY	+	+	2KG	-	-			
ARB	+	+	5KG	-	-			

### Ubicación taxonómica de las cepas fúngicas

El análisis morfológico efectuado con el microscopio biológico mostró que estas cepas pertenecen al género *Trichoderma* sp. de acuerdo al Catálogo de Ainsworth (Kirk y Ainsworth, 2008), encontrándose micelio septado, la presencia de conidióforo hialino muy ramificado, fiálides individuales y en grupos, conidios ovoides, en

pequeños racimos terminales de color verde fuerte a verde olivo, y con presencia de clamidosporas intercalares típicas del género *Trichoderma*.

Cuadro 19. Identificación taxonómica de las cepas bacterianas.

Cepa	Taxón significativo	% ID
T442	<i>Bacillus subtilis</i>	99.9
T3141	<i>Bacillus megaterium</i>	50.8
751	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	96.6
7A1	<i>Pseudomonas</i> sp.	90.0

### Confrontaciones *in vitro*

El efecto antagonista *in vitro* de los agentes biocontroladores del crecimiento micelial de *F. oxysporum ciceris* se muestran en el Cuadro 20. La capacidad antagónica de las cepas ocurrió con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), observándose la formación de tres grupos, el primero integrado por HRG-060 y HRG-050 con el mayor efecto inhibitorio (82.67 y 78.33%), respectivamente; el segundo integrado por T442 y 751, las cuales inhibieron al fitopatógeno en los respectivos 58.7 y 57.3%; y el tercero que formaron T3141 y 7AI, que inhibieron al patógeno en 34.7 y 33.3%, respectivamente. Tanto en los antagonistas fúngicos como bacterianos, los valores de inhibición del crecimiento del patógeno fueron variados, siendo unos altamente inhibitorios mientras que en otros fue limitada, sugiriendo que hay una variación entre el tipo de metabolitos antifúngicos producidos por las cepas, concordando con los resultados obtenidos por Eshetu *et al.* (2015), y López *et al.* (2015).

Con las cepas HRG-060 y HRG-050 (*Trichoderma* sp.) se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) sobre *Foc*, valores muy semejantes a los obtenidos por Aponte *et al.* (2012), con cepas ensayadas para el biocontrol *in vitro* de diferentes patógenos del suelo, incluido *Fusarium*; estos resultados también coinciden con los de Ríos *et al.* (2016), quienes reportan inhibición de crecimiento de *F. oxysporum* en más del 50% con cepas nativas de *Trichoderma* (Figura 9). De las cepas bacterianas, la que ocasionó mayor PICR (58.7%) fue T442, identificada

bioquímicamente como *Bacillus subtilis*, valor que de acuerdo con Gajbhiye *et al.* (2010), es competitivo, ya que en su investigación aislaron e identificaron cepas de *B. subtilis* de la rizósfera de algodón y fueron probadas como agentes biocontrol de *F. oxysporum*, inhibiendo su micelio en más de un 50%.

Cuadro 20. Crecimiento radial *in vitro* de *Fusarium oxysporum ciceris* raza 5, al ser inhibidos por los antagonistas.

Tratamiento	Crecimiento del patógeno (cm)	PIRC (%)
T1= T3141	4.9	34.66 c*
T2= T442	3.1	58.67 b
T3= 751	3.2	57.33 b
T4= 7A1	5.0	33.33 c
T5= HRG-060	1.3	82.67 a
T6= HRG-050	1.6	78.33 a
T7= <i>F. oxysporum ciceris</i> raza 5	7.5	--

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P<0.05).

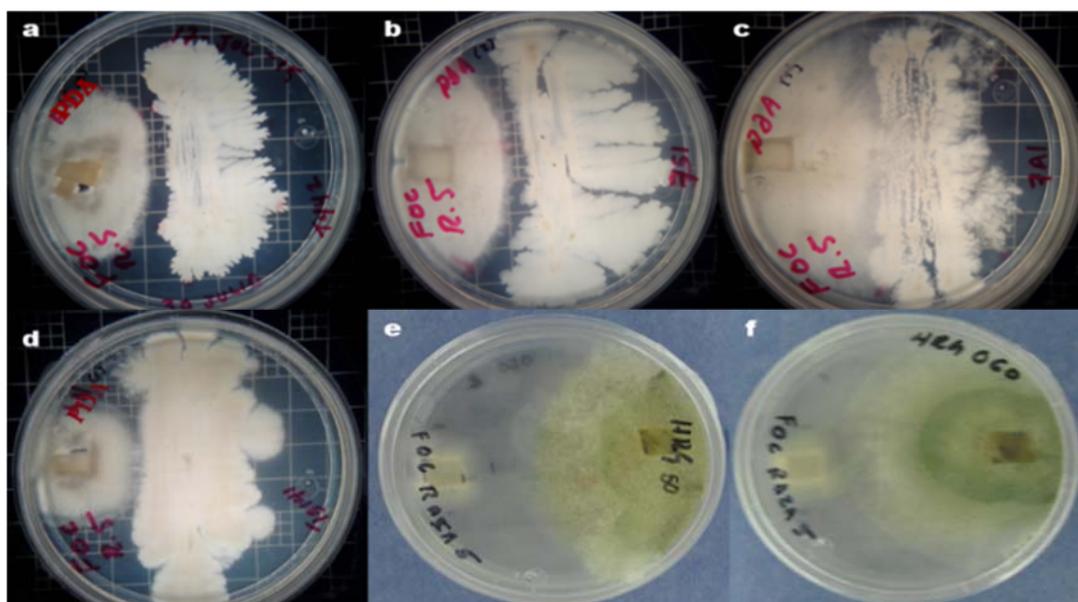


Figura 9. Antagonismo por pruebas de confrontación *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5. Inhibición por antibiosis de las bacterias antagonistas (a-d), a los 10 días de post-inoculación: a) T442, *Bacillus subtilis*; b) 751, *Agrobacterium radiobacter*, c) 7A1, *Pseudomonas* sp.; d) T3141, *Bacillus megaterium*. Inhibición por competencia y micoparasitismo por las cepas fúngicas antagonistas (e-f), a los tres días de post-inoculación: e) HRG-050, *Trichoderma* sp.; f) HRG-060, *Trichoderma* sp.

Mediante diversas investigaciones se ha demostrado que con aplicaciones de *Trichoderma* y *Bacillus subtilis* se obtienen excelentes resultados de biocontrol contra diferentes enfermedades que afectan a diversos cultivos. Así, Moradi *et al.* (2012), evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* y *B. subtilis*, las cuales suprimieron eficazmente la marchitez vascular del garbanzo causada por *F. oxysporum ciceris*. Asimismo, Kumar *et al.* (2011), trabajaron con aislados de *Trichoderma* y *Bacillus* en confrontación con *F. oxysporum lycoperscisi* y reportaron que el porcentaje de inhibición del patógeno por *Trichoderma* osciló en 84.8-44.4%, y entre 63.4-45.1% al emplear aislados de *Bacillus*. Los resultados de esta investigación también coinciden con los de Maciel *et al.* (2012), ya que reportaron que cepas nativas de *Trichoderma* spp. y *B. subtilis* fueron antagonistas contra *F. sambucinum*, señalando que esta acción fue más pronunciada cuando se utilizó *Trichoderma* spp., el cual inhibió en más de 60% a las colonias del fitopatógeno. Por su parte, López *et al.* (2015), reportan que cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* nativas del noroeste de México tuvieron efectividad antagónica *in vitro* para control de la pudrición texana.

El biocontrol de las cepas de *Trichoderma* sp. podría ser atribuido a la producción de enzimas como viridin, trichodermin, trichodermina, tricotoxina, celobiasas, quitinazas y el compuesto 6-pentyl- $\alpha$ -pirona, que le otorga actividad antifúngica y potencial antagónico por micoparásito, al penetrar y causar lisis del micelio de *F. oxysporum* (Martínez *et al.*, 2013); sin embargo, diversos investigadores señalan que la competencia por espacio y nutrientes es una de las principales formas de ejercer el biocontrol sobre los patógenos del suelo (Ezziyani *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Astorga *et al.*, 2014. Por otra parte, el antagonismo ejercido por ciertas cepas de *Bacillus*, es por medio de antibiosis, competencia por espacio y nutrientes e inducción de resistencia sistémica; además, producen algunas enzimas que degradan la pared celular y que están involucradas en la actividad antagonista contra fitopatógenos, así como la producción de compuestos orgánicos volátiles, fitoalexinas y sideróforos (Bhattacharyya y Jha, 2012; Singh y Singh, 2013).

### Efecto protector de las cepas antagonistas

Con excepción de HRG-050, por inoculación de semillas con cinco antagonistas se logró incrementar de manera significativa el vigor de planta con respecto al testigo (Cuadro 21); los mayores efectos se observaron con HRG-060 (*Trichoderma* sp.), T442 (*B. subtilis*) y T3141 (*B. megaterium*), los cuales superaron al testigo en 76, 68 y 50%, respectivamente, incluso en las plantas cultivadas con HRG-060 el vigor fue significativamente mayor que el expresado por aquéllas tratadas con el producto Benomilo (testigo químico).

Cuadro 21. Protección de plantas de garbanzo por inoculación de semillas con cepas antagonistas contra la fusariosis vascular en condiciones de campo.

Tratamientos	Vigor de planta (%)	Marchitez de follaje (%)	Cáncer en raíz (%)
T1= Testigo	45.13 d*	64.20 ab	81.80 a
T2= Químico	62.73 bc	64.13 ab	74.73 ab
T3= 7A1	66.40 b	51.40 cd	65.67 bc
T4= T442	72.73 ab	48.87 d	62.40 bc
T5= 751	51.40 cd	65.80 ab	83.00 a
T6= T3141	67.80 ab	61.60 bc	77.13 a
T7= HRG-050	44.00 d	75.27 a	82.80 a
T8= HRG-060	79.53 a	45.80 d	58.13 c
C.V.	11.53	10.549	10.889

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P< 0.05).

En marchitez de follaje se observaron disminuciones significativas (28.7 y 23.9%) donde se aplicaron las cepas de HRG-060 y T442, respectivamente, en comparación al testigo (Cuadro 21).

Mediante la inoculación de semillas con HRG-060, T442 y 7A1 el cáncer en raíz disminuyó en los respectivos 28.9, 23.7 y 19.7% con respecto al testigo. Además,

con HRG-060 (*Trichoderma* sp.) la disminución del cáncer fue 22.2% mayor que lo que se obtuvo con Benomilo (Cuadro 21).

Estos resultados coinciden con diversos trabajos realizados a nivel de campo, donde se aplicó a estos organismos como antagonistas, reportándose una reducción significativa del cáncer en raíz (Karimi *et al.*, 2012; Moradi *et al.*, 2012; Manjunatha *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2014). De la misma manera, estos antagonistas han sido empleados en otros cultivos para protegerlos del ataque de fitopatógenos; al respecto, Arcos y Zúñiga (2015), inocularon tubérculos de papa con cepas nativas de *Bacillus*, y lograron 60% menos de bulbos infectados con *Rhizoctonia* y *Spongospora*.

El efecto protector de las cepas nativas de HRG-060 (*Trichoderma* sp.) y T442 (*B. subtilis*), quizás se deba a la producción de metabolitos y enzimas que ha sido documentada por diversos investigadores, como Qualhato *et al.* (2013), que refieren que la mayoría de las especies de *Trichoderma* producen y secretan metabolitos tóxicos volátiles como  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, fosfatasa ácida, celulasa y proteasas ácidas, que tienen efectos significativos sobre el crecimiento y desarrollo de los fitopatógenos, pues degradan su pared celular; asimismo, Tchameni *et al.* (2011), que reportan que este género produce sideróforos que detienen el crecimiento de hongos patógenos; además se señala que la competencia por espacio y nutrientes, así como el micoparasitismo son sus principales mecanismos antagónicos, Ezziyyani *et al.* (2004). Otros investigadores afirman que el control biológico por *Bacillus*, es quizá por la producción de enzimas, metabolitos inhibitorios, antibióticos e inducción de la resistencia de la planta a los patógenos (Lima *et al.*, 2014; Lee y Kim, 2016). Por su parte, Orberá *et al.* (2009), reportan que esta bacteria es potencialmente antagónica a *Fusarium* sp. en cultivos ornamentales debido a la excreción de iturina, que actúa como antibiótico para fitopatógenos. Astorga *et al.* (2014), demostraron que los procesos de competencia, antibiosis y parasitismo ejercidos por *Trichoderma* y *Bacillus*, lograron la inhibición y destrucción de *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* sp. y *Pseudomonas marginalis*.

### Efecto estimuladorio del crecimiento vegetal de las cepas antagonistas

La germinación de semillas inoculadas con las cepas antagonistas (Cuadro 22) tuvo su mayor expresión (125, 125 y 100%) con las cepas T442 (*B. subtilis*), 751 (*A. radiobacter*) y HRG-060 (*Trichoderma* sp.) en comparación al testigo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Izzeddin y Medina (2011), quienes al inocular semillas de diferentes hortalizas con cepas de *Trichoderma*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, observaron mayor germinación de las semillas tratadas con respecto al testigo; asimismo, con los de León *et al.* (2009), y Chavarría y Carmona (2016), quienes reportan incrementos significativos en la tasa de emergencia de soya y melina al emplear estos microorganismos como inóculo en las semillas. Por su parte, Shahid *et al.* (2011), aplicó *Trichoderma* en semillas de garbanzo y observaron germinación en más del 90% en laboratorio, superior en 15% al testigo. La estimulación en la germinación de semillas por estas cepas antagonistas puede atribuirse a la capacidad que tienen estos microorganismos de producir sustancias fisiológica y bioquímicamente activas, como giberelinas, citoquininas y ácido indolacético, las cuales estimulan la germinación de las semillas (Camelo *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2014).

Cuadro 22. Efecto en la germinación por la inoculación a las semillas de garbanzo con las cepas antagonistas.

Cepa	Germinación de semillas (%)
T442	90.0 a*
T3141	65.0 c
7A1	76.3 b
751	90.0 a
HRG-050	40.0 d
HRG-060	80.0 ab
Testigo	40.0 d
C.V.	7.002

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P< 0.05).

En cuanto a la altura de las plantas (Cuadro 23), las cultivadas con 7A1 fueron las de menor porte con 27.5% menos en comparación al testigo, mientras que las demás fueron estadísticamente iguales a éste. La misma tendencia se observó en el diámetro de tallo, aunque con HRG-060 se tuvo un incremento de 14.9 % y con T442 de 8.5%. El verdor fue mayor con las cepas HRG-060, T442 y 7A1, con los respectivos incrementos de 12.8, 11.7, 12.6%, comparados con el testigo. El peso fresco y seco tuvieron incrementos de 56.8 y 29.0% con la cepa HRG-060, mientras que el rendimiento por planta se incrementó 155 y 72% con las respectivas cepas de HRG-060 y T442. Con HRG-060 también se tuvieron incrementos de 74.3, 42.8 y 481% más en peso fresco, peso seco y rendimiento de grano por planta, en comparación a los promedios obtenidos con el tratamiento químico (Benomilo).

Cuadro 23. Comportamiento del crecimiento y rendimiento de plantas de garbanzo, cultivado en campo, por la inoculación de semillas con las cepas antagonistas.

Tratamientos	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Verdor (SPAD)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (g planta <sup>-1</sup> )
T1= Testigo	27.96a*	4.71ab	45.31bc	19.89bc	15.49bc	10.03cd
T2= Químico	23.48ab	4.58ab	42.35c	17.86c	14.00c	4.37e
T3= 7A1	20.34b	4.29b	50.97a	19.63bc	13.95c	6.50de
T4= T442	28.17a	5.14ab	50.58a	23.60b	17.53ab	17.17b
T5= 751	26.28ab	4.91ab	40.61c	20.79bc	15.31bc	13.03bc
T6= T3141	23.55ab	5.04ab	43.72c	21.17bc	15.49bc	12.67bc
T7= HRG-050	25.01ab	4.92ab	40.87c	17.19c	13.64c	4.77e
T8= HRG-060	28.11a	5.44a	51.13a	31.24a	19.96a	25.63a
C.V.	14.347	10.993	6.406	10.833	9.567	23.196

\* Letras no comunes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey (P< 0.05).

Los resultados anteriores coinciden con los de Shahid *et al.* (2011), y Yadav *et al.* (2011), ya que al inocular semillas de garbanzo con cepas de *Trichoderma*,

reportaron incrementos significativos en altura y en peso seco de planta; asimismo, con los de Verma *et al.* (2014), y Ávila *et al.* (2015), quienes reportaron incrementos del rendimiento de grano del garbanzo después de inocular semillas con el mismo hongo. Por su parte, Verma *et al.* (2009), inocularon semillas de garbanzo con cepas de *Bacillus* y reportaron incrementos significativos en el peso seco de raíz, parte aérea de la planta, y número de granos; mientras que Arcos y Zúñiga (2016), inocularon papas con cepas nativas de *Bacillus subtilis* y observaron incrementos en altura de plantas, materia seca y rendimiento; De igual manera Jimtha *et al.* (2016), notaron que *Bacillus* promueve notablemente el crecimiento en plantas de jengibre.

El efecto estimulador en el crecimiento y rendimiento del garbanzo por parte de *Trichoderma* (HRG-060), quizás se deba a las hormonas que sintetiza (ácido indol-3-acético, auxinas, giberelinas y citoquininas), a la producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y magnesio, eficiencia en el uso del nitrógeno, producción de ácido glucónico y ácido cítrico, aumento de la solubilización de micronutrientes (hierro y manganeso) o a la actividad antagonista contra *F. oxysporum*, tal como lo señalan numerosos investigadores (Vinale *et al.*, 2008; Harman, 2011; Yadav *et al.* 2011; Verma *et al.*, 2014). Por otra parte, la capacidad de estimulación del crecimiento por *B. subtilis* (T442), también puede ser consecuencia de las vitaminas que sintetiza, de la fijación del nitrógeno atmosférico y la solubilización de fosfatos que las plantas aprovechan (Camelo *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2014; Arcos y Zúñiga, 2016).

## V. CONCLUSIONES GENERALES

- Las cepas T442, 751 y 7A1 correspondieron a *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas* sp., con un porcentaje de confiabilidad superior al 90%, HRG-050 y HRG-060 fueron identificadas como *Trichoderma* sp, mientras que T3141 correspondió a *Bacillus megaterium*, con bajo porcentaje de confiabilidad.
- En las pruebas *in vitro*, la mayor inhibición del crecimiento micelial de *Foc* raza 5 fue con HRG-060, HRG-050, T442 y 751, con un PICR mayor al 50%, demostrando así su efecto antagonista.
- Bajo condiciones de invernadero, las cepas nativas de *Bacillus* sp. T442 y *Trichoderma* sp. HRG-060 lograron disminuir la enfermedad de la fusariosis vascular en más del 30% en promedio, y además, propiciaron condiciones para que las plantas de garbanzo incrementaran el verdor y tuvieran mayor crecimiento y rendimiento.
- En campo, con respecto al efecto protector de las cepas nativas, las mayores respuestas se obtuvieron con HRG-060 y T442, ya que incrementaron el vigor de planta y redujeron la enfermedad en más del 25%. Asimismo, las mejores respuestas en la estimulación del crecimiento vegetal se obtuvieron con HRG-060 y T442, ya que con ellos se incrementó el grosor del tallo, verdor y biomasa, disminuyó la fusariosis y, en consecuencia, se incrementó el rendimiento de grano por planta.
- El uso de *Trichoderma* sp. (HRG-060) y *B. subtilis* (T442) como biofumigantes y biofertilizantes en garbanzo es promisorio bajo el contexto ambiental del centro de Sinaloa. Sin embargo, se recomiendan investigaciones futuras sobre su empleo combinado, identificación molecular y mecanismos antagónicos que ejercen.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abbo, S., J. Berger, and C. Turner. 2003. Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*. 30: 1081-1087.
- Abdulkareem, M., H.M. Aboud, H.M. Saood, and M.K. Shibly. 2014. Antagonistic activity of some plant growth rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. *Int. J. Phytopathol.* 3(1): 49-54.
- Acebo, G.Y., R.A. Hernández, P.M. Heydrich, M. El-Jaziri and L.A.N. Hernández 2012. Management of black pod rot in cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. *Fruits*. 67(1): 41-48.
- Adhilakshmi, M., M. Karthikeyan, and D. Alice. 2008. Effect of combination of bio-agents and mineral nutrients for the management of alfalfa wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. *Phytopath.* 99: 274-281.
- Agrios, G.N. 2006. *Fitopatología*. Editorial Limusa. México, D.F. 510 p.
- Agurto, S.T. 1989. *Manual de Técnicas en Microbiología*. Talleres Gráficos de Imprenta L Pluma Fuente. Lima, Perú. 256 p.
- Ahmad, F., I. Ahmad, and M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163: 173-181.
- Ajitha, P.S., and N. Lakshmedevi. 2010. Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum capsici* incitant of anthracnose on *Bell peppers*. *Nature and Sci.* 8(9): 265-296.
- Akkopru, A., and S. Demir. 2005. Biological control of fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Phytopathology*. 153: 544-550.
- Akrami, M., H. Golzary, and M. Ahmadzadeh. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling Fusarium rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*. 10: 2653-2658.
- Alabouvette, C. 1990. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. En: *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. D. Hornby, ed. CAB International, Wallingford, Reino Unido, 27-43 p.
- Alamri, S., M. Hashem, and Y.S. Mostafa. 2012. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. *Biocontrol Science*. 17(4): 155-167.

- Albareda, M., M.S. Dardanelli, C. Sousa, M. Megías, F. Temprano, and D. Rodríguez-Navarro. 2006. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.
- Alizadeh, H., K. Behboudi, M. Ahmadzadeh, Javan-Nikkhah, M. Zamioudis, C. Corné, M.J. Peter, and A.H.M. Bakker, 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control.* 65: 14-23.
- Al-Taae, A.K., H.A. Hadwan, and S.A.E. Al-Jobory. 2013. Physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in Iraq. *J. Life Sci.* 7: 1070-1075.
- Altomare, C., W.A. Norvell, T. Bjorkman, and G. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied Environmental Microbiology.* 5: 2926-2933.
- Allen, D.J. 1983. *The Pathology of Tropical Food Legumes.* John Wiley and Sons, New York. 413 p.
- Álvarez, L.C., V. W. Osorio, G.M.C. Díez, y M.M. Marín. 2014. Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoam.* 25: 225-241.
- Alves, S.H.S., R.R. Da Silva, D. Macagnan, H.V.B. De Almeida, P.M.C. Baracat, and A. Mounteerd. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biol. Control.* 29: 288-295.
- Ambreen, A., and H. Shahida. 2010. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry.* 82: 313-319.
- Apodaca-Sánchez, M.A. 2006. Enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). En: *Memorias de Enfermedades de Hortalizas.* Fundación Produce-Culiacán, Sinaloa, México. 46 p.
- Aponte, G.Y., L.A. Salazar, M.J. Alcano, N.H. Sanabria, J.J. Guzmán, and A.J. Gámez. 2012. Evaluación en condiciones *in vitro* de la masa micelial de hongos fitopatógenos mediante el uso de filtrados de aislamientos de *Trichoderma* spp. *Agronomía Trop.* 62: 17-24.
- Arcos, J. y D. Zúñiga. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. *Ecol. Apl.* 14(2): 95-101.
- Arcos, J. y D. Zúñiga. 2016. Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas con capacidad para mejorar la productividad en papa. *Revista Latinoamericana de la Papa.* 20(1): 18-31.

- Arkhipova, T.N., E. Prinsen, S.U. Veselov, E.V. Martinenko, A.I. Melentiev, and G.R. Kudoyarova. 2007. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil*. 292: 305-315.
- Arvayo-Ortiz, R.M., M. Esqueda, E. Acedo-Felix, A. Sanchez, and A. Gutierrez. 2011. Morphological variability and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* associated with chickpea (*Cicer arietinum*) crops. *Amer. J. Agric. Biol. Sci.* 6: 114-121.
- Arzate, J., A. Michel, V. Dominguez y O. Santos. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24: 98-104.
- Astorga, Q.K., M.K. Meneses, V.C. Zúñiga, M.J. Brenes, and M.W. Rivera. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*. 27: 82-91.
- Atta, B.M., and T.M. Shah. 2009. Stability analysis of elite chickpea genotypes tested under diverse environments. *Aust. J. Crop. Sci.* 3: 249-256.
- Avendaño, C. y G. Arbeláez. 2006. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol, mediante acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. *Agronomía Colombiana*. 24(1): 62-67.
- Ávila-Miramontes, J.A., G. Padilla-Zaldo, D. Martínez-Heredia, F.J. Rivas-Santoyo, M.A. Coronado-Espericueta, y P. Ortega-Murrieta. 2015. Respuesta de algunos componentes del rendimiento del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación de *Mesorhizobium ciceri*, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en la región agrícola de la costa de Hermosillo. *Biotecnia*. 17(3): 3-8.
- Baayen, R.P., K. O'Donnell, P.J.M. Bonants, E. Cigelnik, L.P. Kroon, E.J.A. Roebroek, and C. Waalwijk. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and non-monophyletic formae speciales causing wilt and rot diseases. *Phytopathology*. 90: 891-900.
- Babaloba, O.O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-1570.
- Bacon, C.W., and D.M. Hinton. 2002. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biol. Control*. 23: 274-284.
- Bacon, C.W., D.M. Hinton, J.K. Porter, A.E. Glenn, and G.A. Kuldau. 2004. Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. *Can. J. Bot.* 82: 878-885.
- Bailey, B.A., 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot

- pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24: 336-351.
- Bailey, B.A. and R.D. Lumsden. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Haman G.E., Kubicek C.P. (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Inc. London, 185-204 p.
- Bailey, B.A., H. Bae, M.D. Strem, J. Crozier, S.E. Thomas, G.J. Samuels, B.T. Vinyard, and K. A. Holmes. 2008. Antibiosis, mycoparasitism and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 46(1): 24-35.
- Bal, H.B., S. Das, T.K. Dangar, and T.K. Adhya. 2012. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J. Basic. Microbiol.* 53: 972-984.
- Bardas, G.A., A.L. Lagopodi, K. Kadoglidou, and K. Tzavella-Klonari. 2009. Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biol. Control*. 49: 139-145.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Advances*. 16: 729-770.
- Basallote-Ureba, M.J. 1987. Relaciones huésped-parásito en la marchitez del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 239 p.
- Bashan, Y., and G. Holguin. 1998. Proposal for the division of Plant Growth Promoting Rhizobacteria into two classification: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30(8): 1225-1228.
- Bayraktar, H., and F.S. Dolar. 2012. Pathogenic variability of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* isolates from chickpea in Turkey. *Pak. J. Bot.* 44: 821-823.
- Baysal, Ö., M. Çalışkan, and Ö. Yeşilova. 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol*. 73: 25-32.
- Baysal, Ö., D. Lai, H.H. Xu, M. Siragusa, M. Çalışkan, and F. Carimi. 2013. A Proteomic Approach Provides New Insights into the Control of Soil-Borne Plant Pathogens by *Bacillus* Species. *PLoS ONE* 8(1): e53182. <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0053182.PDF>. Consultado: junio 2016.
- Bell, D., H. Well, and C. Markham. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72: 379-382.

- Benhamou, N., J. Kloepper, and S. Tuzun. 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*. 204: 153-168.
- Benhamou, N., P. Rey, M. Chérif, J. Hockenhull, and Y. Tirilly. 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*. 87: 108-122.
- Benítez, T., A.M. Rincón, M.C. Limón, and A.C. Codon. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiol.* 7(4): 249-260.
- Bent, A.F., and I.C. Yu. 1999. Applications of molecular biology to plant disease and insect resistance. *Adv. Agron.* 66: 251-298.
- Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84: 11-18.
- Bernal, A., C. Andreu, M. Moya, M. González, y O. Fernández. 2007. Utilización de *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica para control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyd & Hans. *Fitosanidad*. 83: 26-29.
- Berry, C., F.W.G. Dilantha, P.C. Loewen, and T.R. De Kievit. 2010. Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol. Control*. 55: 211-218.
- Bhattacharyya, P.N., and D.K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.
- Bhatti, M.A., and J.M. Kraft. 1992. Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Dis.* 76: 50-54.
- Bland, J.M. 1996. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. *J. Org. Chem.* 61: 5663-5664.
- Bogale, M., B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, and E.T. Steenkamp. 2006. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR, and DNA sequence analyses. *Fungal Divers.* 23: 51-66.
- Bomfim, M.P., A.B. São José, T.N.H. Rebouças, S.S de Almeida, I.V.B. Souza, and N.O. Dias. 2010. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. *Summa Phytopathologica*. 36(1): 61-67.
- Booth, C. 1975. The present status of *Fusarium* taxonomy. *Annual review of Phytopathology*. 13: 83-93.

- Booth, C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic, and taxonomic aspects. The applied mycology of *Fusarium*, 1-13 p. Moss, M.O. and Smith, J.E. (eds). Cambridge University Press, New York, USA. 132 p.
- Bordiec, S., S. Paquis, H. Lacroix, S. Dhondt, E. Ait-Barka, S. Kauffmann, P. Jeandet, F. Mazeyrat-Gourbeyre, C. Clement, F. Baillieul, and S. Dorey. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *Journal Experimental Botany*. 62(2): 595-603.
- Bosland, P.W. 1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology*. 6: 281-289.
- Bousslama, M. 1980. Chickpea improvement in Tunisia. En: Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement. ICRISAT, Hyderabad, India. 277-280 p.
- Brotman, Y., E. Briff, A. Viterbo, and I. Chet. 2008. Role of Swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol*. 147: 779-789.
- Burgess, L.W. 1981. General ecology of the Fusaria. En: *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. P.E. Nelson, T.A., Toussoun, R.J. y Cook, R.J. eds. The Pennsylvania State University Press, University Park, EEUU, 225-235 p.
- Cabrera de la Colina, J., A. Trapero-Casas and R. M. Jiménez-Díaz. 1985. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in Andalucía, southern Spain. *Int. Chickpea Newsl*. 13: 24-26.
- Cabrera de la Colina, J., A. Trapero-Casas, and R.M. Jiménez-Díaz. 1987. Host range and symptomless carriers of *Fusarium* spp. Infecting chickpeas in Andalucía. En: Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, (SEF/MPU, eds.) 20-26 p.
- Calistrus, C., M. McLean, and P. Berjak. 1997. *In vitro* studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. 1. Macroscopical and microscopical observations of fungal interactions. *Mycopathologia*. 139: 115-121.
- Calvo, A.J.A., C.G. Rivera, C.S. Orozco, y R.R. Orozco. 2012. Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*. 23(2): 225-231.
- Camelo, M., S.P. Vera, R. Bonilla. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Rev. Corpoica-Ciencia y Tecnol. Agropecuaria*. 12: 159-66.

- Campell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press, New York, USA. 218 p.
- Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: *Micorrizas*, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una Revisión. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 14(2): 15-31.
- Carrillo, F.J.A. 2011. Manejo de la rabia del garbanzo. En: VII Jornada de Transferencia de Tecnología. Memorias de Capacitación. Fundación Produce Sinaloa-SAGARPA- Gob. de Sinaloa. 31-33 p.
- Carrillo, F.J.A., M.R. Allende, y E.R.S. García. 2012. Métodos reventivos para el control de la rabia y mildiú del garbanzo. En: VIII Jornada del Cultivo de Garbanzo. Memorias de Capacitación. Fundación Produce Sinaloa-SAGARPA-Gob. de Sinaloa. 43-49 p.
- Carson, K.C., J.M. Meyer, and M.J. Dilworth. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. Soil Biol. Biochem. 32(1): 1-21.
- Cawoy, H., W. Bettiol, P. Fickers, and M. Ongena. 2011. *Bacillus*-based biological control of plant diseases, pesticides in the modern world. In: Pesticides use and management (M. Stoytcheva, ed.), In Tech, Rijeka, Croatia, 273-302 p.
- Chakraborty, U., B.N. Chakraborty, M. Basnet, and A.P. Chakraborty. 2009. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. Journal of Applied Microbiology. 107(2): 625-634.
- Chan, Z., and S. Tian. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Postharvest Biology and Technology. 36: 215-223.
- Charana, W., and M. Yoon. 2013. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria and their co-inoculation efficiency on tomato plant growth and phosphorous uptake. African Journal Microbiology Res. 7(3): 266-275.
- Chavarría-Vega, M., y R. Carmona-Solís. 2016. Efecto de microorganismos antagonistas en el control de la enfermedad denominada "Nectria" en la melina *Gmelina arborea* Roxb. Revista Forestal Mesoamericana Kurú. Volumen especial 21-29.
- Chen, F., M. Wang, Y. Zhang, J. Luo, X. Yang, X. Wang. 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. W. J. Microbiol Biotechnol. 26: 675-684.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Innovative approaches to plant disease control. I. Chet (ed.) John Wiley and Sons, New York. 147-160 p.

- Chet, I., G. Harman, R. Baker. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*. 7: 29-38.
- Chet, I., and H. Benhamou. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Harman, G.; Kubicek, C. (eds.) *Trichoderma & Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis. London. 153-152 p.
- Chowdappa, P., S.P.M. Kumar, M. Jyothi, and K.K. Upreti. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*. 65: 109-117.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement, and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9): 4951-4959.
- Contreras, C., H.A., L. Macías R., C. Cortés P., and J. López B. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 149(3): 1579-1592.
- Cook, R.J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology*. 75: 25-29.
- Cook, R.J., and K.F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St Paul, American Phytopathological Society. 539 p.
- Cooney, J.M., D.R. Lauren, and M.E. Di-Menna. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 522-526.
- Correa, O.S., M.S. Montecchia, M.F. Berti, M.C. Fernández-Ferrari, N.L. Pucheu, N.L. Kerber and A.F. García. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*. 41: 185-194.
- Costerton, J.W. 1980. *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease. In: C.D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland. 15-24 p.
- Côte, F.X., C. Abadie, R. Achard, P. Cattan, C. Chabrier, M. Dorel, L. Lapeyre de Bellaire, J.M. Risède, F. Salmon, and P. Tixier. 2009. Integrated pest management approaches developed in the French West Indies to reduce pesticide use in banana production systems. *Acta Horticulturae*. 828: 375-382.
- De Bach, P. 1997. *Lucha biológica contra los enemigos de las plantas*. Ed. MundiPrensa, Madrid, 399 p.

- De Cal, A., R. Garcia-Lepe, and P. Melgarejo. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: histological studies of infected and induced tomato stem. *Phytopathology*. 90: 260-268.
- De Candolle, A. 1883. *Origine des Plantes Cultivees*. Paris: 258-260 p.
- Dehner, C.A., J.D. Awaya, P.A. Maurice, J.L. DuBois. 2010. Roles of siderophores, oxalate, and ascorbate in mobilization of iron from hematite by the aerobic bacterium *Pseudomonas mendocina*. *Appl. Env. Microbiol.* 76: 2041-2048.
- Deighton, F.C., J.A. Stevenson, and G.B. Cummins. 1962. *Formae speciales* and the code. *Taxon*. 11: 70-71.
- De la Fe, C.F., y P.J. Hernández. 2011. Descripción de seis nuevas líneas de garbanzos (*Cicer arietinum* L.) en fincas de productores. *Cultivos Tropicales*. 32(4): 44-48.
- Demain, A.L., and A. Fang. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemi Engineer Biotechnol.* 69: 1-39.
- Demers, J.E., C.D. Garzon, and M.M. Jimenez-Gasco. 2014. Striking genetic similarity between races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* confirms a monophyletic origin and clonal evolution of the chickpea vascular wilt pathogen. *Eur. J. Plant Pathol.* 139: 303-318.
- De Miguel, G.E. 1991. *El garbanzo: Una alternativa para el secano*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 132 p.
- Dennis, C., and J. Webster. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1971. Production of nonvolatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57: 25-39.
- Djonović, S., M. Pozo, and C. Kenerley. 2006. Tvbg3, a  $\alpha$ -1,6 glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol.* 72(12): 7661-7670.
- Do Carmo, F.L., H.F. dos Santos, E.F. Martins, J.D. Van Elsas, A.S. Rosado, and R.S. Peixoto. 2011. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. *J. Microbiol.* 49: 535-543.
- Dolar, F. S. 1997. Determination of the races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* in Ankara province. Turkey. *J. Turk. Phytopath.* 26: 11-15.
- Donoso, E. 2013. Situación del control biológico en Chile: mercado, legislación y percepción de los agricultores. En: Montealegre J.R., Pérez L.M. (eds). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile*. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 121–137 p. Disponible on line en: ([http://www.agren.cl/control\\_biologico\\_enfermedades\\_de\\_plantas\\_en\\_chile](http://www.agren.cl/control_biologico_enfermedades_de_plantas_en_chile)).

- Droby, S., M. Wisniewski, D. Macarisin, and C. Wilson. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*. 52: 137-145.
- Druzhinina, I.S., V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz, C.M. Kenerley, E. Monte, P.K. Mukherjee, S. Zeilinger, I.V. Grigoriev, and C.P. Kubicek. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Rev Micro*. 9: 749-759.
- Dwi, S., P. Siti, and M. Erman. 2010. Control of *Fusarium* wilt of chili with *Chitinolytic* bacteria. *Hayati Journal of Biosciences*. 17(1): 5-8.
- Earl, A. M., R. Losick, and R. Kolter. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 16(6): 269-275.
- Echandi, E. 1970. Wilt of chickpeas or garbanzo beans (*Cicer arietinum*) incited by *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 60: 1539-142.
- Elad, Y., Y. Zvieli, and I. Chet. 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection*. 5: 288-292.
- Elías, R., O. Arcos, y G. Arbeláez. 1989. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Colombiana*. Volumen VI: 25-30.
- Elkoca, E., M. Turan, and M. Donmez. 2010. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* rumbv. *phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Elkoca-05'). *Journal of Plant Nutrition*. 33(14): 2104-2119.
- Elshafie, H.S., I. Camele, E. Ventrella, L. Scrano, S. Lovelli, S.A. Bufo, and M. Amato. 2013. Use of plant growth promoting bacteria (pgdb) for promoting tomato growth and its evaluation as biological control agent. *International Journal of Microbiology Research*. 5(5): 452-457.
- Eshetu, B., A. Amare, and A. Seid. 2015. Antagonistic effect of native *Bacillus* isolates against black root rot of faba bean. *African Crop Science Journal*. 23(3): 249-259.
- Estrella, F.S., M.A. Elorrieta, G.C. Vargas, M.J. Lopez, and J. Moreno. 2001. Selective isolation of antagonist microorganisms of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biol Cont Plant Path*. 24: 109-112.
- Ezziyyani, M., C. Perez-Sanchez, A. Sid, M.E. Requena, y M.E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como fungicidas para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. 26: 35-45.
- FAOSTAT, 2016. <http://www.fao.org>., consulado octubre 2015.

- Fekadu, A., and A. Tesfaye. 2013. Antifungal activity of secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* isolates as a biocontrol agent of chocolate spot disease (*Botrytis fabae*) of faba bean in Ethiopia. *African Journal of Microbiology Research*. 7: 5364-5373.
- Fernández, E.A. 2007. Manejo Biológico de *Phytophthora capsici* leo., *Fusarium oxysporum* schlehtend: fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28: 35-42.
- Ferron, P. 1981. Pest Control by the Fungi Beauveria and Metarhizium In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Edited by H.D. Burge. Academic. Press, London and New York. 465-481 p.
- Fgaier, H., and H.J. Eberl. 2010. A competition model between *Pseudomonas fluorescens* and pathogens via iron chelation. *J. Theoret. Biol.* 263: 566-578.
- Fgaier, H., B. Feher, R.C. Mckellar, and H.J. Eberl. 2008. Predictive modeling of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* under iron limitation. *J. Theoret. Biol.* 251: 348-362.
- Fibach-Paldi, S., S. Burdman, and Y. Okon. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326: 99-108.
- Filippi, M.C.C., G.B. Silva, M.V.B. Cortes, V.L.S. Lobo, A.S. Prabhu. 2012. Indução de resistência e promoção de crescimento em arroz por agentes biológicos. In: *Indução de resistência em plantas a patógenos*. Rodrigues F.A., Fortunato A.A., Resende R.S. (Eds). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 280 pp.
- Fravel, D., C. Olivain, and C. Alabouvette. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytol.* 157: 493-502.
- Frisullo, S., F. Ciccarese, M. Amenduni, and H.R. Zamani. 1989. Wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Schlech. in southern Italy. *Difesa delle Piante*. 12: 181-182.
- Fulchieri, M., and L. Frioni. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize effect of yield in field experiment in central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923.
- Gacitúa, A., S.F. Valiente, C.P. Díaz, K.C., Hernández, J.M.M. Uribe, and V.E. Sanfuentes. 2009. Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 69: 526-533.
- Gajbhiye, A., A.R. Rai, S.U. Meshram, and A.B. Dongre. 2010. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 26: 1187-1194.

- Gajera, H.P., and D.N. Vakharia. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74: 274-282.
- Garassini, L.A. 1967. *Microbiología Agrícola*. Imprenta Universitaria. Maracaibo, Venezuela. 646 p.
- García, G., P. Moreno, J. Peña-Cabriales, and J.M. Sanchez-Yañez. 1995. Respuesta del maíz (*Zea mays*, L.) a la inoculación con bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>. *TERRA*. 13: 71-79.
- García, C., R.G., M.A. Arcia M., M.R. Pérez T. y R.F. Riera T. 2012. Efecto de *Trichoderma* sobre el desarrollo de papa y el biocontrol de *Rhizoctonia* bajo tres tiempos de inicio de aplicación. *Agronomía Trop*. 62(1-4): 77-95.
- Garcia, T.V., N. Knaak, and L.M. Fiuza. 2015. Bacterias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. *Arq. Inst. Biol*. 82: 1-9.
- Gary, E., and C. Kubicek. 2005. *Trichoderma* and *Gliocladium*, enzymes, biological control and commercial applications. Edit. Taylor & Francis e-Library. 351 p.
- Garret, S.D. 1977. *Pathogenic root- infecting fungi*. Cambridge Press. 294 p.
- Gatel, F., and M. Champ. 1998. Grain legumes in human an animal nutrition—up to date results and question marks. Opportunities for High Quality, Health and Added—value Crops to Meet European Demands. Proceedings of 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, Valladolid, Spain. AEP. Paris 7-11 p.
- Gaur, P.M., S. Tripathi, C.L.L. Gowda, R.G.V. Ranga, H.C. Sharma, and S. Pande. 2010. Chickpea seed production manual. Patancheru, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 28 p.
- Ghirardi, S., F. Dessaint, S. Mazurier, T. Corberand, and J.M. Raaijmakers. 2012. Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of *Pseudomonas Fluorescent*. *Microb Ecol*. 64: 725-737.
- Ghisalberti, E.L., M.J. Narbey, M.M. Dewan, and K. Sivasithamparam. 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil*. 121(2): 287-291.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol*. 41: 109-117.
- Goldman, G.H., C. Hayes, and G.E. Harman. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology*. 12: 478-482.
- Gómez, G.R.M. 2002. El Cultivo del Garbanzo Blanco en el Centro de Sinaloa. Folleto para productores. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-CEVACU-FPS. Culiacán, Sinaloa, México. No. 48: 1485-1496.

- Gorgen, C.A., A.N. Da Silveira, L.C. Carneiro, V. Ragagnin, and J.M. Lobo. 2009. White mold control with mulch and *Trichoderma harzianum* 1306 on soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 44: 1583-1590.
- Gray, E.J., and D.L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395-412.
- Guédez, C., C. Castillo, L. Cañizales, y R. Olivar. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Revista Control Biológico*. 7(13): 50-74.
- Guédez, C., L. Cañizales, C. Castillo y R. Olivar. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *RSVM*. 32: 44-49.
- Guerrero-Aguilar, B.Z., J.A. Acosta-Gallegos, B.M. Sánchez-García, P.F. Ortega-Murrieta, y M.M. González-Chavira. 2015. Razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo cultivado en Guanajuato, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 38(2): 183-190.
- Gurr, G., y S. Wratten. 2000. *Measures of success in biological control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 448 p.
- Gutiérrez-Manero, F., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F. Tadeo, and M. Talon. 2001. The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111: 206-211.
- Guzmán, A., M. Obando, D. Rivera, R. Bonilla. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 14: 182-90.
- Halila, M.H., and R.N. Strange. 1996. Identification of the casual agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* race 0. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 67-74.
- Handelsman, J., S. Raffel, E.H. Mester, L. Wunderlich, and C.R. Grau. 1990. Biological control of *damping-off* of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(3): 713-718.
- Hardalo, C., and S.C. Edberg. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 47-75.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96(2): 190-194.

- Harman, G.E. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity *New Phytol.* 189: 647-652.
- Harman, G.E., R. Petzoldt, A. Comis, and J. Chen. 2004a. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopath.* 94: 147-153.
- Harman, G.E., C. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004b. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. *Nat Rev.* 2: 43-56.
- Hassan, N., M.M. Elsharkawy, M. Shimizu, and M. Hyakumachi. 2014. Control of root rot and wilt diseases of roselle under field conditions. *Mycobiology.* 42(4): 376-384.
- Haware, M.P., and Y.L. Nene. 1982a. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease.* 66: 809-810.
- Haware, M.P., and Y.L. Nene. 1982b. Symptomless carriers of the chickpea wilt *Fusarium*. *Plant Disease.* 66: 250-251.
- Haware, M.P., Y.L. Nene, and S.B. Mathur. 1986a. Seed-borne diseases of chickpea. *In: Technical Bulletin. Danish Government Institute of Seed Technology for Developing Countries (eds), Vol. 1, 32 p.*
- Haware, M.P., Y.L. Nene, and S.B. Mathur. 1986b. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in soil in absence of chickpea. *En: Management of Soilborne Diseases of Crop Plants: Proceedings of National Seminar, 8-10 p.*
- Haware, M.P., R.M. Jiménez-Díaz, K.S. Amin, J.C. Phillips, and M.H. Halila. 1990. Integrated management of wilt and root rots of chickpea. *In: Chickpea in the Nineties ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics) (Ed). ICRISAT Center, Patancheru, India, 129-133 p.*
- Hermosa, M.R., I. Grondona, E.A. Iturriaga, J.M. Diaz-Minguez, C. Castro y E. Monte. 2000. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(5): 1890-1898.
- Hernández-Rodríguez, A., Y. Ruíz-Beltrán, Y. Acebo-Guerrero, Y. Miguélez-Sierra, y M. Heydrich-Pérez. 2014. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en *Theobroma cacao* L. Estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Protección Vegetal.* 29(1): 11-19.
- Herrera, R. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernaderos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago. 60 p.
- Hjeljord, L.G., and A. Tronsmo. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. 131-151 p. *In: Harman G., Kubicek C. (Eds) Trichoderma*

- & *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis. London. 293 p.
- Hjeljord, L.G., A. Stensvand, and A. Tronsmo. 2000. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biolog Control*. 19(2): 149-160.
- Hohmann, P., E.E. Jones, R.A. Hill, and A. Stewart. 2011. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. *Fungal Biology*. 115(8): 759-767.
- Hossain, S., R. Ford, D.M. Neil, C. Pittock, and J.F. Panozzo. 2010. Inheritance of seed size in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and identification of QTL based on 100-seed weight and seed size index. *Aust. J. Crop. Sci.* 4: 126-135.
- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 87(1): 4-10.
- Howell, C. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*. 96: 178-180.
- Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet, y S. Orduz. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agron. Colomb.* 26(3): 451-458.
- Hoyos-Carvajal, L., S. Orduz, and J. Bissett. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol. Control*. 51: 409-416.
- Huang, X., N. Zhang, X. Yong, X. Yang, and Q. Shen. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQRN43. *Microbiological Research*. 167: 135-143.
- Huisman, J., and A.F.B. vander Poel. 1994. In: Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes. Muchlbauer, F.J. and Kaiser, W.J. (eds). Kluwer Academic Publishers. 53-77 p.
- Infante, D., B. Martínez, N. González, y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Veg.* 24(1): 14-21.
- Irina, D., and P.K. Christian. 2004. Species and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocera*: from aggregate species to species clusters. *J. of Zhejiang Uni. Sci.* 6: 100-112.
- Islam, R., Y.T. Jeong, Y.S. Lee, and C.H. Song. 2012. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* c9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*. 40: 59-66.

- Ivana, P., V. Jelena, S. Mirjana, K. Dejana, R. Emil, S. Miloš, and M. Svetlana. 2012. Impact of fungicides used for wheat treatment on button mushroom cultivation. *Pestic. Phytomed.* 27(1): 9-14.
- Izzeddin, A.N., y T.L. Medina. 2011. Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus.* 15(3): 8-12.
- Jalali, B.L., and H. Chand. 1992. Chickpea wilt. In: Singh US, Mukhopadhyay A.N., Kumar J., Chaube H.S., (eds). *Plant Diseases of International Importance. Vol. I. Diseases of cereals and pulses.* Englewood Cliffs, NY: Prentice Hall, 429-444 p.
- Janisiewicz, W., T. Tworkoski, and C. Sharer. 2000. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology.* 90: 1196-1200.
- Jha, B.K., M. Grandhi Pragash, J. Cletus, G. Raman, and N. Sakthivel. 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new *fluorescent pseudomonad* strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 25(4): 573-581.
- Jiménez C., N.S. Albarracín, G. Altuna, y M. Alcano. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ).* 28: 1-10.
- Jiménez-Díaz, R.M. 1994. La Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: 15 años de Investigación en España. *Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales. Fuera de Serie 2:* 285-294.
- Jiménez-Díaz, R.M. 1996. Micosis vasculares. En: *Patología Vegetal, Tomo II.* G. Llácer, M.M. López, A. Trapero y A. Bello (eds). *Sociedad Española de Fitopatología y M.V. Phytoma-España, Valencia.* 913-937 p.
- Jiménez-Díaz, R. M., and M. M. Jiménez-Gasco. 2011. Integrated management of *Fusarium* wilt diseases. In: Alves-Santos F.M., Díez J.J. (eds.) *Control of Fusarium Diseases.* Research Signpost, Kerala, India, 177-215 p.
- Jiménez, G.M.M., A.E. Pérez, D.R.M. Jiménez. 2011. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 y 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* whit random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology.* 107: 237-248.
- Jiménez-Díaz, R.M., and A. Trapero-Casas. 1985. Use of fungicide treatments and host resistance to control the wilt and root rot complex of chickpeas. *Plant Dis.* 69: 591-595.

- Jiménez-Díaz, R.M., M.J. Basallote-Ureba, and H. Rapoport. 1989a. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. In: Vascular Wilt Diseases of Plants. E. C. Tjamos and C. H. Beckman (eds). NATO ASI Series, Vol. H28. Springer-Verlag, Berlin. 113-121 p.
- Jiménez-Díaz, R. M., A. Trapero-Casas, J. Cabrera de la Colina. 1989b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* infecting chickpea in southern Spain. In: Vascular Wilt Diseases of Plants. E. C. Tjamos and C. H. Beckman (eds). NATO ASI Series, Vol. H28. Springer-Verlag, Berlin. 515- 520 p.
- Jiménez-Díaz, R.M., A. Trapero-Casas, and J.L. Cubero. 1989c. Importance of chickpea soilborne diseases in the Mediterranean Basin. In: Proceedings of the Consultancy Meeting on Breeding for Disease Resistance in Kabuli Chickpeas. K. B. Singh and M. C. Saxena (eds). ICARDA, Aleppo, Siria. 155-169 p.
- Jiménez-Díaz, R.M., A.R. Alcalá-Jiménez, A. Hervás, and J.L. Trapero-Casas. 1993. Pathogenic variability and hosts resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem. In: Proc. Eur. Semin. *Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance, 3rd Ed. Hodowla Róślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo. Plant Breeding and Acclimatization Institute, Radzików, Poland. 87-94 p.
- Jiménez-Díaz, R.M., P. Castillo, M.M. Jiménez-Gasco, B.B. Landa, J.A. Navas-Cortes. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: *Biology, ecology and management, Crop Protection*. Consultado en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- Jiménez, F.D. 2011. Estudio de la interacción de *Fusarium* spp. con cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) asociados a la Fusariosis Vascular mediante técnicas biotecnológicas. Tesis. Universidad de Córdoba. 112 p.
- Jimenez-Fernandez, D., B.B. Landa, S. Kang, R.M. Jimenez-Díaz, and J.A. Navas-Cortes. 2013. Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. PLoS One. 8(4): e61360.
- Jiménez-Gasco, M.M., and R.M. Jiménez-Díaz. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction based-assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 and 6. Phytopathology. 93: 200-209.
- Jiménez-Gasco, M.M., E. Pérez-Artés, and R.M. Jiménez-Díaz. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5, and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). Eur. J. Plant Pathol. 107:237-248.
- Jiménez-Gasco, M.M., M.G. Milgroom, and R.M. Jiménez-Díaz. 2002. Gene genealogies support *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* as a monophyletic group. Plant Pathol. 51: 72-77.

- Jimtha John, C., P. Jishma, G.B. Arathy, C. Anisha, and E.K. Radhakrishnan. 2016. Identification of plant growth promoting Rhizosphere *Bacillus* sp. WG4 antagonistic to *Pythium myriotylum* and its enhanced antifungal effect in association with *Trichoderma*. *Journal of soil science and plant nutrition*, Epub 04 de mayo de 2016. Consultado en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000026>
- Joshi, B., P. Bhatt, and D. Bahukhandi. 2010. Antagonistic and plant growth activity of *Trichoderma* isolates of Western Himalayas. *Journal of Environmental Biology*. 31: 921-928.
- Jukanti, A.K., P.M. Gaur, C.L. Gowda, R.N. Chibbar. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *Br. J. Nutr.* 108: S11-S26.
- Kaiser, W.J., and D. Danesh. 1971. Etiology of virus-induced wilt of *Cicer arietinum*. *Phytopathology*. 61: 453-457.
- Kaiser, W.J., A.R. Alcalá-Jiménez, A. Hervás-Vargas, J.L. Trapero-Casas and R.M. Jiménez-Díaz. 1994. Screening of wild *Cicer* species for resistance to race 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease*. 78: 962-967.
- Kang, S.M., A.L. Khan, Y.H. You, J.G. Kim, M. Kamran, and I.J. Lee. 2014. Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *J. Microbiol Biotechnol.* 24: 106-112.
- Kannaiyan, J. 1981. Diseases of chickpea in Malawi. *International Chickpea Newsletter*. 4: 16-21.
- Karimi, K., J. Amini, B. Harighi, and B. Bahramnejad. 2012. Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science*. 6: 695-703.
- Karunai, B. 2013. Preparation of phosphate solubilizing microbial inoculant using vermicompost as a carrier material. *Research Journal of Agricultural Sciences*. 4(2): 146-149.
- Katz, E., and A.L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*. 41(2): 449-474.
- Kaur, N.P., and A.N. Muthamilan. 1992. Integrated control of chickpea wilt complex by *Trichoderma* and chemical methods in India. *Tropical Pest Management*. 38: 372-375.
- Kaur, R., J. Macleod, W. Foley, and M. Nayudu. 2006. Gluconic acid: An antifungal agent produced by *Pseudomonas* species in biological control of take-all. *Phytochem*. 67: 595-604.

- Kazan, K., and F.J. Muehlbauer. 1991. Allozyme variation and phylogeny in annual species of *Cicer* (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution*. 175: 1121-1123.
- Kempf, H.J., R.J. Scheffer, and J. Ligon. 1997. Examples of Novartis research activities regarding the use of bacteria in disease control. In: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects*. A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo and S. Akino (eds). Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan. 124-125 p.
- Kim, D.S., R.J. Cook, and D.M. Weller. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*. 87(5): 551-1164.
- Kirk, P.M., and Ainsworth G.C. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th Ed. Collingwood, Vic: CSIRO Publishing. New York, USA. 771 p.
- Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*. 87: 474-479.
- Kloepper, J.W. 1996. Biological control agents vary in specificity for host, pathogen control, ecological habitat and environmental conditions. *Bio. Sci.* 46: 406-409.
- Kloepper, J.W., M.N. Schroth, and T.D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*. 70: 1078-1082.
- Kloepper, J.W., S. Tuzun, L. Liu, and G. Wei. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. In: *Pest Management: Biological Based Technologies*. R. D. Lumsden, J. L. Vaughn (eds). Washington DC. American Chemical Society Books. 156-165 p.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz, and R.M. Zablotowicz. 1999. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- Kloepper, J.W., R. Choong-Min, and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 94: 1259-1266.
- Ko, H.S., Jin, R.D., Krishnan, H.B., Lee, S.B. and Kim, K.Y. 2009. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora blight* is mediated by the production of 4-Hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes. *Current Microbiology*. 59: 608-615.
- Kraft, J.M. 1994. Fusarium wilt of peas (a review). *Agronomie*. 14: 561-567.
- Kraft, J.M., M.P. Haware, R.M. Jimenez-Diaz, B. Bayaa, and M. Harrab. 1994. Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. In: *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Muehlbauer F.J., Kaiser W.J. (eds). Dordrecht, Kluwer Academic Publ, Holanda. 268-289 p.

- Krauss, U.E., R. Hidalgo, V. Bateman, C. Adonijah, J. Arroyo, J. García, N.A. Crozier, G.M. Brown, T. Hoopen, and K. Holmes. 2010. Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological Control*. 54(3): 230-240.
- Küçük, Ç. and M. Kivanç. 2004. *In vitro* Antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turk J. Biol.* 28: 111-115.
- Kumar, P., R. Thenmozhi, P.D. Anupama, A. Nagasathya, N. Thajuddin, and A. Paneerselvam. 2012. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Research Journal of Biological Sciences*. 6: 523-531.
- Kumari, S.G., K.M. Makkouk, M.H. Loh, K. Negassi, S. Tsegay, and R. Kidane. 2008. Viral diseases affecting chickpea crops in Eritrea. *Phytopathol Mediterr.* 4(1): 42-49.
- Kupper, K.C., E. Wickert, A.P. Aukar, E. Rivas, y A. Goes. 2010. Diversidad genética de aislados de *Bacillus subtilis* con potencial para el control biológico de *Colletotrichum acutatum* y *Guignardia citricarpa*. *Summa Phytopatholog. Botucatu*. 36(3): 195-202.
- Ladizinsky, G. 1975. A new *Cicer* from Turkey. *Notes of the Royal Botanic Garden, Edinburgh*. 34: 201-202.
- Ladizinsky, G., and A. Adler. 1976. The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica*. 25: 211-217.
- Lalucat, M.J., and E. Garcia-Valdes. 2010. DNA sequence-based analysis of the Mulet *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol.* 12(6): 1513-1530.
- Lamsal, K., S.W. Kim, Y.S. Kim, and Y.S. Lee. 2012. Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of *Anthraco*se caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper. *Mycobiology*. 40(4): 244-251.
- Landa, B.B., J.A. Navas-Cortés, and R.M. Jiménez-Díaz. 2004a. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *Fusarium* wilt of chickpea. *Plant Pathol.* 53: 341-352.
- Landa, B.B., J.A. Navas-Cortés, and R.M. Jiménez-Díaz. 2004b. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology*. 94: 946-960.
- Landa, B.B., J.A. Navas-Cortés, M.M. Jiménez-Gasco, J. Katan, B. Retig, and R.M. Jiménez-Díaz. 2006. Temperature response of chickpea cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causal agent of *Fusarium* wilt. *Plant Dis.* 90: 365-374.

- Larralde-Corona, C., M. Santiago, A. Sifuentes, I. Rodríguez, K. Shirai, and J. Narváez. 2008. Control potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80: 167-177.
- Larrea, I. I., B.C. Falconí, and A.A. Arcos. 2015. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Rev. Colombiana Biotecnol.* 17: 140-148.
- Lazarovits, G., and J. Nowak. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *Scientia Horticulturae.* 32: 188-192.
- Łażniewska, J., V.K. Macioszek, A.K. Kononowicz. 2012. Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 78: 24-30.
- Leclere, V., M. Bechet, A. Adam, J.S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Thonart, F. Gancel, M. Chollet-Imbert, and P. Jacques. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organisms antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 4577-4584.
- Lee, Y.S., and K.Y. Kim. 2016. Antagonistic potential of *Bacillus pumilus* L1 Against root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. *J. of Phytopathology.* 164: 29-39.
- León, M., P.M. Yaryura, M.S. Montecchia, A.I. Hernández, O.S. Correa, N.L. Pucheu, N.L. Kerber, and A.F. García. 2009. Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soybean rhizosphere. *International Journal of Microbiology* Volume 2009, Article ID 572049, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2009/572049>
- Leslie, J.F., and A. Summerell B. 2006. *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Lev-Yadun, S., A. Gopher, and S. Abbo. 2000. The cradle of agriculture. *Science.* 288: 1602-1603.
- Ligon, J.M., D.S. Hill, P.E. Hammer, N.R. Torkewitz, D. Hofmann, H.J. Kempf, and K.H. van Pée. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science.* 56: 688-695.
- Lima, O.D.R., L.J.M.G. Oliveira, M.S.B.S. Silva, and A.A.C. Rodrigues. 2014. Ação antifúngica *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Caatinga.* 27(4): 57-64.
- Link, J.H.F. 1809. *Observationes in Ordines plantarum naturales.* Gesellschaft Naturforschender Freunde Berlin. 3: 3-42.
- Liu, Y.F., Z.Y. Chen, T.B. Ng, J. Zhang, M.G. Zhou, F.P. Song, and Y.Z. Liu. 2006. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides.* 28: 553-559.

- López, M.R., M. Ros, and J.A. Pascual. 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biol. Control*. 56(1): 59-66.
- López, V.B.E., B.A.D. Armenta, V.S. Hernández, S.M.A. Apodaca, G.J.A. Samaniego, M.K.Y. Leyva, and O.A. Valdez. 2015. Selección *in vitro* e identificación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos para el control de *Phymatotrichopsis omnívora*. *ITEA*. 111: 310-325.
- Lorito, M., G. Harman, A. Prieto, and C. Hayes. 1990. Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning. *Phytopathol.* 82(10): 10-77.
- Lucas, J.A., A. García-Villaraco, J. García-Cristobal, E. Algar, J. Gutierrez-Mañero. 2013. Structural and functional study in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. plants growing under biotic and abiotic stress. *J. Appl. Microbiol.* 115: 218-235.
- Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Lumsden, R.D. 1992. Mycoparasitism of soilborne plant pathogens. En: *Mycology series; Vol. 9: The Fungal Community. Its organization and role in the ecosystem*. Second edition. Ed.: George C. Carroll y Donald T. Wicklow. 931 pp.
- Maciel, C.G., C. Walke, M.F.B. Muniz, and M.M. Araujo. 2014. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii engelm.* *Revista Árvore*. 38(3): 505-512.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, S.W. Kwon, and T.M. Sa. 2010. *Bacillus methylothrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 2490-2495.
- Madigan, M., and J. Martinko. 2005. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA. 1152 p.
- Malik, D.K., and S.S. Sindhu. 2011. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17: 25-32.
- Malviya, M.K., A. Sharma, A. Pandey, K. Rinu, P. Sati, and L.M.S. Palni. 2012. *Bacillus subtilis* NRRL B-30408: A potential inoculant for crops grown under rain fed conditions in the mountains. *Journal of Soil Science And Plant Nutrition*. 12(4): 811-824.
- Manjunatha, S.V., M.K. Naik, M.F.R. Khan, and R.S. Goswami. 2013. Evaluation of bio-control agents for management of dry root rot of chickpea caused by *Macrophomina phaseolina*. *Crop Protection*. 45: 147-150.

- Marchi, M., M. Boutin, K. Gazengel, C. Rispe, J.P. Gauthier, A.Y. Guillermer-Erckelboud, L. Lebreton, M. Barret, S. Daval, and A. Sarniguet. 2013. Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environ Microbiol Report*. 5(3): 393-403.
- Marois, J., D. Mitchell, and R. Sonoda. 1981. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato under field conditions. *Ecology and Epidemiology*. 71(12): 1257-1259.
- Martínez-Absalón, S.C., M.C. Orozco-Mosqueda, M.M. Martínez-Pacheco, R. Farías-Rodríguez, M. Govindappa, and G. Santoyo. 2012. Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*. 11: 2665-2673.
- Martinez, C., F. Blanc, E. Le Claire, O. Besnard, M. Nicole, and J.C. Baccou. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol*. 127: 334-344.
- Martínez, B., Y. Reyes, D. Infante, E. González, H. Baños, y A. Cruz. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Protección Vegetal*. 23(2): 118-125.
- Martínez, B., D. Infante, y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg*. 28(1): 1-11.
- Matiru, V.N., and F. Dakora. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*. 3: 1-7.
- Mayak, S.T. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*. 166: 525-530.
- Medeiros, F.H., A.W. Pomella, J.T. de Souza, G.R. Niella R. Valle, R.P. Bateman, D. Fravel, B. Vinyard, and P.K. Hebbar. 2010. A novel, integrated method for management of witches broom disease in cacao in Bahia, Brazil. *Crop Protection*. 29(7): 704-711.
- Melgarejo, P., and E. Sagasta. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stromata by *Monilinia laxa* in culture. *Can. J. Bot*. 67: 83-87.
- Melnick, R.L., C. Suárez, B.A. Bailey, and P.A. Backman. 2011. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biol. Control*. 57: 236-245.
- Mendoza, V.R., C. Romo, y C. Hernández. 1995. Efectividad de *Bacillus subtilis* y Fungibac Sobre *Rhizoctonia solani* Kuhn en Papa Bajo Invernadero. *Rev. Agraria Científica*. 11(2): 120-127.

- Merchán-Gaitán, J.B., R.L. Ferrucho, and J.G. Álvarez-Herrera. 2014. Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 8: 44-56.
- Merkuz, A., and A. Getachew. 2012. Management of chickpea wilt (*Fusarium oxysporum* f-esp *ciceris*) using *Trichoderma* spp. *International Journal of Current Research*. 4(5): 128-134.
- Michel, A.A., C. Rebolledo, G.R. Lezama, M.M.E. Ochoa, E.J.C. Escamilla, y G. Samuels. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mangos afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(2): 154-160.
- Michel, A.A., C.A. Reyes, S.M.A. Otero, D.O. Rebolledo, and G.R. Lezama. 2005. Potencial antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schelechtend: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23(3): 284-291.
- Michel-Aceves, A., M. Otero-Sánchez, R. Martínez-Rojero, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala, y A. Rebolledo-Martínez. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Guerrero, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 12(3): 55-68.
- Mohandas, S., R. Manjula, R.D. Rawal, H.C. Lakshmikantha, S. Chakraborty, and Y.L. Ramachandra. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents in managing *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* infection in banana cv. Neypoovan. *Biocontrol Sci. Techn.* 20(2): 165-181.
- Mora, Y., R. Diaz, C. Vargas-Lagunas, H. Peralta, G. Guerrero, and A. Aguilar. 2014. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: Phylogeny, physiology, and genome analysis. *Applied and environmental microbiology*. 80(18): 5644-5654.
- Moradi, H., B. Bahramnejad, J. Amini, A. Siosemardeh, and K. Haji-Allahverdipoor. 2012. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *Plant Omics Journal*. 5(2): 68-74.
- Moreno, M.T., and J.I. Cubero. 1978. Variation in *Cicer arietinum* L. *Euphytica*. 27: 465-485.
- Morsy, E.M., K.A. Abdel-Kawi, and M.N.A. Khalil. 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. *Egyptian Journal of Phytopathology*. 37(1): 47-57.
- Muehlbauer, F.J. and K.B. Singh. 1987. Genetics of chickpea. In: Saxena M.C., Singh K.B. (eds). *The Chickpea*. CAB International 99-125 p.

- Mukherjee, K.P., C.S. Nautiyal, and A.N. Mukhopadhyay. 2008. Molecular mechanisms of biocontrol by *Trichoderma* spp. In: Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. In Soil Biology. C. Shekhar Nautiyal and P. Dion (edt). Vol. 15. Springer, Heidelberg, Germany. 483 p.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Naher, L., U.K. Yusuf, A. Ismail, and K. Hossain. 2014. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases Pak. J. Bot. 46(4): 1489-1493.
- Naik, P.R., N. Sahoo, D. Goswami, N. Ayyadurai, and N. Sakthivel. 2008. Genetic and functional diversity among *Fluorescent Pseudomonads* isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial Ecology*. 56(3): 492-504.
- Naik, M.K., H.M. Madhukar, and G.S. Devika-Rani. 2009. Evaluation of biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates and methods of its application against wilt of chilli (*Capsicum annuum* L.) caused by *Fusarium solani* (Mart) Sacc. *Journal of Biological Control*. 23(1): 31-36.
- Nandhini, S., V. Sendhilvel, and S. Babu. 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the wilt pathogen. *Journal of Biopesticides*. 5: 178-185.
- Narasimhan, R. 1929. A preliminary note on a *Fusarium* parasitic on Bengal gram (*Cicer arietinum*). *Madras Agricultural Department Year Book*. 511 p.
- Nascimento, I.O., R.A.A. Costa, F.H. Moraes, F.A. Sousa, C.M.A. Filipe and C.A. Moraes. 2016. Isolation, identification and *in vitro* evaluation of *Bacillus* spp. in control of *Magnaporthe oryzae* comparing evaluation methods. *Afr. J. Agric. Res.* 11(19): 1743-1749.
- Navas-Cortés, J.A., B. Hau, and R.M. Jiménez-Díaz. 1998. Effect of sowing date, host cultivar, and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt of chickpea. *Phytopathology*. 88: 1338-1346.
- Navas-Cortés, J.A., A.R. Alcalá-Jiménez, B. Hau, and R.M. Jiménez-Díaz. 2000a. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of *Fusarium* wilt in chickpea cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 135-146.
- Navas-Cortés, J.A., B. Hau, and R.M. Jiménez-Díaz. 2000b. Yield loss in chickpeas in relation to development of *Fusarium* wilt epidemics. *Phytopathology*. 90: 1269-1278.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En: *Fungal Wilt Diseases of Plants*. M. E. Mace, A. A. Bell y C. H. Beckman, eds. Academic Press, NY, EEUU. 51- 80 p.

- Nene, Y.L., and M.P. Haware. 1980. Screening for chickpea resistance to wilt. *Plant Disease*. 64: 379-380.
- Nene, Y.L., and M.V. Reddy. 1987. Chickpeas diseases and their control. En: *The Chickpea*. M.C. Saxena y K.B Singh (eds.). Oxford, C.A.B International. 223-270 p.
- Nene, Y.L, V.K. Sheila, and S.B. Sharma. 1989. *Legumes Pathol. Prog. Rep.* 7: 1-23.
- Nene, Y.L, V.K. Sheila, and S.B. Sharma 1996. A World List of Chickpea and Pigeon Pea Pathogens. ICRISAT Pulse Pathology Progress Report. Patancheru, India. 27 p.
- Nico, A.I., C.I. Mónaco, G. Dal Bello, y H. Alippi. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II. Microflora asociada y antagonismo *in vitro* de los aislados más frecuentes. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 34(1): 29-44.
- Nielsen, M.N., J. Sorensen, J. Fels, and H.C. Pedersen. 1998. Secondary metabolite- and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3563-3569.
- Nour, E., and E.N.A. El-Ghiet. 2011. Efficacy of *Pseudomonas fluorescens* as biological control agent against *Aeromonas hydrophila* infection in *oreo chromis niloticus*. *World J Fish Marine Sci*. 3(6): 564-569.
- Nuncio, O.G., R. Mendoza V., V. Robledo T., M. Vázquez B. y J.J. Almaraz S. 2015. Influencia de rizobacterias en la germinación y vigor de semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. 'var. Grande'). *ITEA*. 111(1): 18-33.
- Okubara, P.A., D.R. Call, Y.S. Kwak, D.Z. Skinner. 2010. Induction of defense gene homologues in wheat roots during interactions with *Pseudomonas fluorescens*. *Biol. Control*. 55: 118-125.
- Omay, S., W.A. Schmidt, and P. Martin. 1993. Indolacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd. under *in vitro* conditions. *Can. J. Microbiol.* 39: 187-192.
- Orberá, R.T.M., D.M. J. Serrat, and G.Z. González. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas. *Fitosanidad*. 13(2): 95-100.
- Ortigoza, F.J., and Ruiloba, L.S.L. 1998. *Microbiología Práctica*. Departamento de Microbiología. 2a Ed. ENCB-IPN. México. 205 p.
- Ortíz-Castro, R., H.A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, and J. López-Bucio. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4: 701-712.

- Ortiz-Martínez, J., G. Hernández-Ramírez, M. Cruz-Tobón, K.A. Figueroa-Rodríguez, F. Hernández-Rosas, and B. Figueroa-Sandoval. 2013. Inhibición *in vitro* de aislamientos nativos de *Trichoderma* en presencia de la cepa comercial T22. *Rev. Col. de Biotec.* 15(1): 126-136.
- Osorio, S. 2008. Agricultura sustentable: Una alternativa de alto rendimiento. *Ciencia UANL.* 77-81.
- Páez, M.E., y N. Sanabria. 2007. Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. de la Facultad de Agronomía (LUZ).* 24: 27-31.
- Palleroni, N.J. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* (Vol. 2, Part B). New York, USA. 323-370 p.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 23-54.
- Paredes-Escalante, J.E., J.A. Carrillo-Fasio, R.S. García-Estrada, R. Allende-Molar, J.A. Sañudo-Barajas, y J.B. Valdez-Torres. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Rev. Mexicana de Fitopatología.* 27(1): 27-35.
- Pastrana, A.M., M.J. Basallote-Ureba, A. Aguado, K. Akdi, and N. Capote. 2016. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea.* 55(1): 109-120.
- Paredes E., J.E., J.A. Carrillo F., J.A. Sañudo B., R. Allende M., y R.S. García E. 2011. Enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp. y su correlación con la inhibición *in vitro* de patógenos causantes de la pudrición de la raíz del garbanzo. *Rev. Mex. de Fitopatología.* 29(1): 73-75.
- Park, J.W., K. Balaraju, J.W. Kim, S.W. Lee, and K. Park. 2013. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biological Control.* 65(2): 246-257.
- Patten, C.L., and B.R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indolacetic and indevelopment of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 98: 3795-3801.
- Perelló, A.E., and G.M. Dal Bello. 2011. Suppression of tan spot and plant growth promotion of wheat by synthetic and biological inducers under field conditions. *Annals of Applied Biology.* 158(3): 267-274.
- Pérez, C.A. y A.L. Chamorro. 2013. Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 5(2): 439-462.

- Phillips, J.C. 1988. A distinct race of chickpea wilt in California. International Chickpea Newsletter. 18: 19-21.
- Podile, A. R., and A.P. Prakash. 1996. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF-1. Can. J. Microbiol. 42(6): 533-538.
- Poupin, M.J., T. Timmermann, A. Vega, A. Zuñiga, and B. González. 2013. Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 8(7): e69435. doi:10.1371/journal.pone.0069435
- Prashar, P., N. Kapoor, and S. Sachdeva. 2013. Isolation and characterization of *Bacillus* sp with *in vitro* antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* from rhizosphere of tomato. Journal of Agricultural Science and Technology 15: 1501-1512.
- Probanza, A., J.A. Lucas, N. Acero, F. J. Gutierrez-Mañero. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* L.) gaertn growth I. characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. Plant and Soil. 182: 59-66.
- Punja, Z.K. 1997. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. Canadian Journal of Plant Pathology. 19: 315-323.
- Qualhato, T.F., F.A. Lopes., A.S. Steindorff, R.S. Brandao, R.S. Jesuino and C.J. Ulhoa. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnology Letters. 35(9): 1461-1468.
- Quiroz, S.V.F., C.R. Ferrera, A. Alarcón, y H.M.E.L. Lara. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Rev. Mexicana de Micología. 26: 27-34.
- Radheshyam, S., Joshi A., and R.C. Dhaker. 2012. A brief review on mechanism of *Trichoderma* fungus use as biological control agents. International Journal of Innovations in Bio-Sciences. 2(4): 200-210.
- Raheja, P.C., and G.P. Das. 1957. Development studies in crop plants II. Effect of cultural treatments on the incidence of gram wilt. Indian Journal of Agricultural Science. 27: 237-250.
- Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam, R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection. 20(1): 1-11.
- Reddy, A.A., V.C. Mathur, M. Yadav, and S.S. Yadav. 2007. Commercial Cultivation and Profitability. In: S. S. Yadav, R. Redden, W .Chen, B. Sharma (eds) Chickpea Breeding and Management. CABI, UK, 291-320 p.

- Reino, J.L., R.F. Guerrero, R. Hernández-Galán, and I.G. Collado. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.* 7: 89-123.
- Reis, V.M., J.I. Baldani, V.L.D. Valdani and J. Dobereiner. 2000. Biological dinitrogen fixation in grammineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant. Soil.* 19: 227-247.
- Reyes, R.A., J. Cristóbal A., E. Ruiz S. y J.M. Tun S. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad.* 16(3): 161-165.
- Reyes, Y., B. Martínez, y D. Infante. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Rev. Protección Veg.* 23(2): 112-117.
- Ríos-Velasco, C., J.M. Caro-Cisneros, D.I. Berlanga-Reyes, M.F. Ruiz-Cisneros, J.J. Ornelas-Paz, M.A. Salas-Marina, E. Villalobos-Pérez, and V.M. Guerrero-Prieto. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Rev. Mexicana de Fitopatología.* 34(1): 84-99.
- Rives, N., Y. Acebo, y A. Hernández. 2007. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza Sativa* L.). *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales.* 28(2): 29-38.
- Robertson, L.D., B. Ocampo, and K.B. Singh. 1997. Morphological variation in wild annual *Cicer* species in comparison to the cultigen. *Euphytica.* 95: 309-319.
- Robinson-Boyera, L., J. Jegerb, M. Xu, and P. Jeffries. 2009. Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology.* 19(10): 1051-1065.
- Rodríguez, H., R. Fraga, T. González, and Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287: 15-21.
- Rodríguez, J.E., J. Velandia, y S.E. Viteri. 2010. Evaluación de microorganismos aislados de gallinaza por su potencial para el biocontrol de *Fusarium* (*F. oxysporum*) en plántulas de uchuva (*Physalis peruviana*). *Rev. Facultad Nacional de Agronomía Medellín.* 63(2): 5499-5509.
- Rojó, F.G., M.M. Reynoso, M. Ferez, S.N. Chulze, and A.M. Torres. 2007. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection.* 26: 549-555.
- Rosas, S.B., G. Vanzini, E. Carlier, C. Pasluosta, N. Pastor, and M. Rovera. 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology & Biochemistry.* 41: 1802-1806.

- Ru, Z., and W. Di. 2012. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. African Journal of Biotechnology. 11(18): 4180-4186.
- Ruano-Rosa, D., and C.J. López-Herrera. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as Biocontrol Agents Against Avocado White Root Rot. Biological Control. 51(1): 66-71.
- Ruiz, S.E., A.J. Cristóbal, R.A. Reyes, S.J. Tun, R.A. García, and A.J. Pacheco. 2014. *In vitro* antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soils of the Yucatan Peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita*. Rev. Inter. J. Experimental Botany. 83: 45-47.
- SAGARPA. 2016. <http://www.siap.gob.mx/avance-de-siembras-y-cosechas-por-cultivo/>. Consultado: mayo 2016.
- Saleem, M., M. Arshad, S. Hussain, and A.S. Bhatti. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34: 635-648.
- Samuels, G.J. 2006. *Trichoderma*: systematics the sexual state and ecology. Phytopathol. 96(2): 195-206.
- Sánchez, L.D.B., H.A.M. García, P.F.A. Romero, y B.R.R. Bonilla. 2014. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. Rev. Colomb. Biotecnol. 16(2): 122-128.
- Sansinenea, E., and A. Ortiz. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. Biotechnology Letters. 33: 1523-1538.
- Santoyo, G., M.C. Orozco-Mosqueda, and M. Govindappa. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. Biocontrol Science and Technology. 22(8): 855-872.
- Sanz, L., M. Montero, J. Redondo, A. Llobell, E. Monte. 2005. Expression of an  $\alpha$ -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. FEBS Journal. 272: 493-499.
- SAS (Statistical Analysis System Institute). 2002. SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 27513. USA.
- Scervino, J.M., M.P. Mesa, M.I. Della, M. Recchi, M. Sarmiento, and A. Godeas. 2010. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol. Fertil. Soils 46: 755-763.
- Schippers, B.K., R.J. Scheffer, B.J.J. Lugtengerg, and P.J. Weisbeek. 1995. Biocoating of seeds with plant growth promoting rhizobacteria to improve plant establishment. Outlook in agriculture. 24: 179-185.

- Schübler, A., D. Schwarzott, and C. Walker. 2001. A new fungal *phylum*, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105: 1413-1421.
- Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defense. *Cur. Op. Plant Biol.* 12: 459-464.
- Shahid, M., A. Singh, M. Srivastava, C.P. Sachan, and S.K. Biswas. 2011. Effect of seed treatment on germination and vigour in chickpea. *Trends in Biosciences*, 4: 205-207.
- Sharma, R., D. Singh, and R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 50: 205-221.
- Sharon, E., I. Chet, and Y. Spiegel. 2011. *Trichoderma* as a Biological Control Agent (Chapter 8). In: Davies K., Spiegel Y. (eds). *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, Springer Science. 310 p.
- Shoresh, M., G. Harman, and F. Mastouri. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21-43.
- Showkat, S., I. Murtaza, O. Laila, and A. Ali. 2012. Biological Control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. by *Pseudomonas fluorescens* isolated from wheat rhizosphere soil of Kashmir. *J Pharm Biol. Sci.* 1(4): 24-32.
- Shu-Mei, Z. 2012. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African Journal of Microbiology Research*. 6(8): 1747-1755.
- Shuter, A., and M. Schmoll. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 787-799.
- Siddiqui, Z.A., and M.S. Akhtar. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Techn.* 18(3): 279-290.
- Silva, N.V., G. Dias S., C.M. Mantovanello L. e R. Harakava. 2011. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. *Pesq. Agropec. Bras.* 46(12):1609-1618.
- Singh, A., and M.N. Islam. 2010. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. *Inter. J. Experimental Agriculture* 1(1): 20-25.
- Singh, G. 2003. Studies on essential oils. Chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour Frag. J.* 18: 62-65.

- Singh, G., W. Chen, D. Rubiales, K. Moore, Y.R. Sharma, and Y. Gan. 2007. Diseases and their management. En: S. S. Yadav, R. Redden, W. Chen, B. Sharma (eds) Chickpea Breeding and Management. CABI, UK, 497-519 p.
- Singh, J.S., V.C. Pandey, and D.P. Singh. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140: 339-353.
- Singh, K.B. 1987. Chickpea breeding. In: M.C. Saxena, K.B. Singh (eds). *The Chickpea*. Cabi, Uk. 127-162 p.
- Singh, K., and M. Reddy. 1991. Advances in diseases resistance breeding in chickpea. *Advances in Agronomy*. 45: 191-222.
- Singh, K.B., and M.C. Saxena. 1996. Winter Chickpea in Mediterranean-type environments. *A Technical Bull. ICARDA, Aleppo, Siria*. 39 pp.
- Singh, K.B, and S.M. Virmani. 1996. Modeling growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Res*. 46: 41-49.
- Singh, J.S., and D.P. Singh. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Microbes in sustainable agriculture. In: A. Malik, E. Grohmann and M. Alves (eds). *Management of Microbial Resources in the Environment*. Springer Netherlands. 361-385 p.
- Singh, V., N. Singh, L. Yadav, K. Awasthi, B. Joshi, K. Singh, J. Singh, and K. Duttamajumder. 2010. Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane. *Journal of Horticulture and Forestry*. 2: 66-71.
- Sivamani, E., and S.S. Gnanamanickam. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil*. 107(1): 3-9.
- Sivan, A., and I. Chet. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*. 71(7): 587-692.
- Sivan, A., and I. Chet. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol*. 135: 675-682.
- Sivasithamparam, K., and L. Ghisalberti. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman G.E., Kubicek C.P. (eds). *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis Ltd., London. 293 p.
- SlideShare, 2015. Taxonomía y clasificación de hongos. En: <http://es.slideshare.net/rogerasalmeron/clase-5-taxonomia-y-clasificacion-de-los-hongos-2015>. Consultado junio 2016.
- Solano, J., L.F., X. Mata G., y O. Murillo G. 2015. Efecto de extractos de metabolitos de dos aislados nativos *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de brotes juveniles de melina (*Gmelina arborea* Roxb. ex Sm.) bajo condiciones de minitúnel. *Rev. Forestal Mesoamericana Kurú*. 12(29): 53-68.

- Sosa, L.A.I., R.V.P. Álvarez, C.D. Torres, and R.L. Casadesús. 2011. Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia Solani* Kühn y *Sclerotium Rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 15: 39-43.
- Souto, G.I., O.S. Correa, M.S. Montecchia, N.L. Kerber, N.L. Pucheu, M. Bachur, and A.F. Garcia. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 1247-1256.
- Srivastavaa, R., A. Khalidb, U.S. Singhc, and A.K. Sharma. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, *fluorescent Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*. 53: 24-31.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 56: 845-857.
- Stepanova, M.Y. 1971. Spread of *Fusarium oxysporum* in legumes. *Trudy. Ves. Inst. Zashch.* 29: 100-105.
- Stevenson, P.C., H.C. Turner, and M.P. Haware. 1997. Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*). *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 50: 167-178.
- Sturz, A.V., B.R. Christie, and J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19(1): 1-30.
- Suárez, E.F., G.M.C. Vargas, M.J. López, J. Moreno. 2007. Effect of horticultural waste composting of infected plant residues with pathogenic bacteria and fungi: integrated and localized sanitation. *Waste Management*. 27: 886-892.
- Suárez, L., y R. Alba. 2013. Aislamiento de microorganismos para el control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*. 62(4): 370-378.
- Suárez, L., y C. Cabrales. 2008. Identificación de las especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp., y *Bacillus* sp., y evaluación de su potencial antagonista *in vitro* frente al hongo fitopatógeno nativo *M. roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Rev. Universidad Francisco de Paula Santander*. 13(1): 45-56.
- Sugha, S.K., S.K. Kapoor, and B.M. Singh. 1994. Factors influencing Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* 24: 97-102.
- Sun, Y., Z. Cheng, and B.R. Glick. 2009. The presence of a 1- aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PSJN. *FEMS Microbiol. Lett.* 296: 131-136.

- Sunar, K., P. Dey, U. Chkraborty, and B. Chakreborty. 2013. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. *J. Basic Microbiol.* 10: 1002-1014.
- Sundaramoorthy, S., Balabaska. P. 2013. Evaluation of combined efficacy of *pseudomonas fluorescens* and *bacillus subtilis* in managing tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). *Plant Pathology J.* 12: 154-161.
- Tchameni, S.N., M.E. Ngonkeu, B.A. Begoude, L. Wakam, R. Fokom, A.D. Owona, J.B. Mbarga, T. Tchana, P.R. Tondje, F.X. Etoa, and J. Kuate. 2011. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. *Crop Protection.* 30(10): 1321-1327.
- Tejera, B., M. Heydrich, and M.M. Rojas. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protec. Veg.* 27(2): 117-122.
- Tenorio-Salgado, S., R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, J. Caballero-Mellado, E. Pérez-Rueda. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered.* 4: 236-243.
- Torres, M.R., V. Sanchis, and A.J. Ramos. 1998. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *International Journal of Food Microbiology.* 39: 139-143.
- Torres, E., J. Lannacone, y H. Gómez. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia.* 67(1): 169-178.
- Torres-Rubio, M.G., S.A. Valencia-Plata, J. Bernal-Castillo, and P. Martínez-Nieto. 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of Indol-3-Acetic Acid and siderophores from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42: 171-175.
- Toure, Y., M. Ongena, P. Jacques, A. Guiro, P. Thonart. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Applied Microbiology.* 96: 115-1160.
- Trapero-Casas, A. 1983. La marchitez y podredumbre de la raíz del garbanzo en el Valle del Guadalquivir: Importancia, distribución, etiología, epidemiología y medios de lucha. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, Córdoba, 295 p.
- Trapero-Casas, A., y R.M. Jiménez-Díaz. 1985a. Etiología, importancia y distribución de la seca del garbanzo en el Valle del Guadalquivir. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. 97 pp.
- Trapero-Casas, A., and R.M. Jiménez-Díaz. 1985b. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology.* 75: 1146-1151.

- Trapero-Casas, A., and R.M. Jiménez-Díaz. 1986. Influence of sowing date on *Fusarium* wilt and *Ascochyta blight* of chickpea in southern Spain. In: Abstracts, International Food Legume Conference on Pea, Lentil, Faba bean and Chickpea. Spokane, Washington, USA. College of Agriculture, University of Idaho, USA.
- van der Maesen, L.J.G. 1972. *Cicer* L., a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.) its ecology and distribution. Mendeligen Landbouwhoge school Wageningen. 341 p.
- van der Maesen, L.J.G., N. Maxted, F. Javadi, S. Coles, and A.M.R. Davies. 2007. Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. In: S. S. Yadav, R. Reeden, W. Chen, B. Sharma (eds) Chickpea Breeding and Management. CABI, UK, 14-46 p.
- Vacheron, J., G. Desbrosses, M.L. Bouffaud, B. Touraine, Y. Moenne-Loccoz, D. Muller, L. Legendre, and F. Wisniewski-Dye. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Prigent-Combaret. Front Plant Sci.4: 356. Published online 2013 September 17. doi: 10.3389/fpls.2013.00356. Consultado: julio 2016.
- Varshney, R.K., C. Song, R.K. Saxena, and S. Azam. 2013. Draft genome sequence of kabuli chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. Nature Biotechnology. 31: 240-246.
- Velarde, F.S., S.M. Ramirez, G.F. Zamora, C.M.G. García, A.A.O. Gaspar, T.J. Ureta, C.H. Astengo, A.J. Valdez. 2009. Resistencia de Variedades de Garbanzo a Rabia. En: Memoria VI Jornada de Transferencia de Tecnología del Cultivo del Garbanzo. Fundación Produce Sinaloa-SAGARPA- Gob. del Edo. de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa. 39-44 p.
- Velarde-Félix, S., F. Zamora-Galván, N. Valdez-Rubio, L. Cárdenas-Molina, R. López-Molina, J.A. Ángeles-Valdéz, G.A. Fierros-Leyva, P.F. Ortega-Murrieta, I. Padilla-Valenzuela, y E. Gutierrez-Pérez. 2013. Distribución y presencia de la fusariosis del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Noroeste de México y búsqueda de resistencia en condiciones controladas. In: Memoria Simposio Nacional de Garbanzo. INIFAP. 54-64 p.
- Velarde-Félix, S., P.F. Ortega-Murrieta, G.A Fierros-Leyva., I. Padilla-Valenzuela, E. Gutierrez-Pérez, F.G. Rodríguez-Cota, J.A. López-Valenzuela, J.A. Acosta-Gallegos, y J.A. Garzón-Tiznado. 2015. Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el noroeste de México. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas. 6(4): 735-748.
- Vera, R., B. Moreno, R. Acevedo, y E. Trujillo. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp., por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. Rev. Fitopatología Venezolana. 18(1): 1-7.

- Verma, J.P., J. Yadav, and K.N. Tiwari. 2009. Effect of *Mesorhizobium ciceri* and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation and yields of chickpea. In India, Biological Forum-an International Journal. 1(2):11-14.
- Verma, J.P. and J. Yadav. 2012. Evaluation of plant growth promoting rhizobacteria and their effect on plant growth and grain yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture production. IJREISS. 2: 51-57.
- Verma, J.P., J. Yadav, K.N. Tiwari, and D.K. Jaiswal. 2014. Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. Soil Biology and Biochem. 70: 33-37.
- Vilchez, S., and M. Manzanera. 2011. Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. Appl. Microbiol. Biotechnol. 91: 1297-1304.
- Villamil, J.E.C., J.O.V. Blanco, and S.E.R. Viteri. 2012. *In vitro* evaluation of Native microorganisms for their antagonism against *Moniliophthora roreri* Cif & Parin Cocoa (*Theobroma cacao* L.). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 65(1): 6305-6315.
- Vinale, F., R. Marra, F. Scala, L. Ghisalberti, M. Lorito, and K. Sivasithamparam. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiol. 43: 143-148.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, L.E. Ghisalberti, R. Marra, L.S. Woo, and M. Lorito. 2008a. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry. 40(1): 1-10.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, M.J. Barbetti, H. Li, S.L. Woo, and M. Lorito. 2008b. A novel role of *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology. 72: 80-86.
- Wang, Y., Y. Bao, D. Shen, W. Feng, T. Yu, J. Zhang, X. D. Zheng. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. International Journal of Food Microbiology. 123: 234-239.
- Wani, P.A., and S. Khan M. 2010. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. Food Chem. Toxicol. 48: 3262-3267.
- Welbaum, G., A.V. Sturz, Z. Dong, and J. Nowak. 2004. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. Critical Review in Plant Sciences. 23(2): 175-193.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 52: 487-511.

- Wilson, C.L., A. Ghaouth, E. Chalutz, S. Droby, C. Stevens, V. Khan, and J. Arul. 1994. Potencial of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease*. 78(9): 837-844.
- Woo, S., F. Scala, M. Ruocco, M. Lorito. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*. 96: 181-185.
- Woo, S., and M. Lorito. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M., Gressel J. (eds). *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer. 107-130 p.
- Wollenweber, H.W., and O.A. Reinking. 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Paul Parey, Berlin Germany. 78 p.
- Yadav, J., J.P. Verma, and K.N. Tiwari. 2011. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian Journal of Biological Sciences*. 4: 291-299.
- Yasar, E., E. Sezai, H. Ayhan, C. Ramazan. 2010. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*. 43: 91-98.
- Yedidia, I., N. Benhamou, and I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*. 65: 1061-1070.
- Yezli, W., N. Zebboudj-Yezli, N. Hamini-Kadar, M. Kihal, and J.E. Henni. 2015. An *in vitro* antagonistic activity evaluation of rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) isolated from the Algerian west. *International Journal of Biosciences*. 7(1): 95-103.
- Yuan, J., Y. Ruan, B. Wang, J. Zhang, R. Waseem, Q. Huang, and Q. Shen. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6-enriched bio-organic fertilizer suppressed *Fusarium* Wilt and promoted the growth of banana plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 3774-3780.
- Zaccardelli, M., F. De Nicola, D. Villecco, and R. Scotti. 2013. The development and suppressive activity of soil microbial communities under compost amendment. *Journal of soil science and plant nutrition*. 13(3): 730-742.
- Zamanizadeh, H.R., N. Hatami, M.M. Aminae, and F. Rakhshandehroo. 2011. Application of biofungicides in control of damping disease off in greenhouse crops as a possible substitute to synthetic fungicides. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 8(1): 129-136.

- Zeilinger, S., and M. Omann. 2007. *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*. 1: 227-234.
- Zhang, S., R. Waseem, X. Yang, J. Hu, Q. Huang, Y. Xu, X. Liu, W. Ran, and Q. Shen. 2008. Control of *Fusarium* wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer. *Biol Fertil Soils*. 44: 1073-1080.
- Zhang, Q.L., Y. Liu, G.M. Ai, L.L. Mia, H.Y. Zhen, and Z.P. Liu. 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology*. 108: 35-44.
- Zhoinska, E., B. Lejczak, and P. Kafarsi. 1992. Organophosphate utilization by wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2993-2999.
- Zhu, X.F., Y. Zhou, and J.L. Feng. 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 8: 831-838.
- Zivkovic, S., S. Stojanovic, Z. Ivanovic, V. Gavrilovic, T. Popovic, and J. Balaz. 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloesporioides*. *Archives of Biological Science Belgrade*. 62: 611-623.
- Zohary, D., and M. Hopf. 2000. Domestication of plants in the old world: The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley, third ed. Oxford University Press, Oxford, UK. 280 p.