

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

CONTROLLING FUSARIUM WILT OF CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.) WITH NATIVE MICROORGANISMS OF SINALOA, MEXICO

Luz del C. Oliva-Ortiz¹, Teresa de J. Velázquez-Alcaraz¹, Rogelio Sosa-Pérez², Leopoldo Partida-Ruvalcaba³, Tomás Díaz-Valdés¹, Julio Arciniega-Ramos¹, Carlos A. López-Orona^{1*}

¹Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Agronomía. Carretera Culiacán-Eldorado km. 17.5. 80398. Culiacán de Rosales, Sinaloa, México. ²Centro de Ciencias de Sinaloa. Avenida de las Américas 2771 Norte. Culiacán de Rosales, Sinaloa, México. ³Universidad Tecnológica de Culiacán, carretera Culiacán-Imala km 2, en la Ciudad Educadora del Saber. 80014. Culiacán de Rosales, Sinaloa, México. (clopezorona@uas.edu.mx).

RESUMEN

La fusariosis vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) aumenta debido a la dificultad para controlarla. El control químico disminuye la biodiversidad y contamina el ambiente, por lo cual se deben desarrollar medidas sustentables para limitar la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el potencial de cepas bacterianas y fúngicas, nativas de Sinaloa, como agentes biocontrol de esta enfermedad en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero. La hipótesis fue que las cepas bacterianas y fúngicas nativas son una alternativa para controlar de la fusariosis vascular del garbanzo porque inhiben *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. La inhibición de las cepas de control biológico se evaluó sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, el principal agente causal de la enfermedad en Sinaloa, mediante la técnica de cultivo dual en medio de cultivo PDA. Los experimentos se realizaron en invernadero, el diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento, cada repetición tuvo 10 macetas, y cada maceta contenía dos plantas. Vigor de planta, marchitez en follaje y cáncer de raíz se evaluaron con una escala subjetiva; se cuantificaron altura de planta (cm), clorofila (unidades SPAD 502), biomasa húmeda y seca (g), diámetro de tallo (mm) y rendimiento (g planta⁻¹). La cepa nativa de *Trichoderma* sp. HRG-060 destacó por la mayor inhibición micelial *in vitro* (PIRC: 80.07 %) y por su capacidad de colonizar el 100 % de superficie del micelio crecido del patógeno en 3 d. El mayor rendimiento de grano fue en las plantas con la cepa *Trichoderma* sp. HRG-060

ABSTRACT

Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.) has spread, due to the difficulty to control it. Chemical control diminishes the biodiversity and pollutes the environment, so sustainable measures must be developed to limit the disease. Therefore, the objective of this study was to determine the potential of Sinaloa's native bacterial and fungal strains, as biological control agents of this disease in chickpea plants grown in greenhouses. Because native bacterial and fungal strains inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the hypothesis was that those strains are an alternative to control fusarium wilt in chickpea. The radial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, race 5—the principal agent that causes this disease in Sinaloa—was evaluated to study the inhibition of biological control strains, using the dual culture technique in a PDA growing medium. The experiments were carried out in a greenhouse. The experimental design was completely random, with five repetitions per treatment; each repetition had ten pots, and each pot had two plants. Plant vigor, foliage wilt, and root canker were evaluated using a subjective scale; plant height (cm), chlorophyll (SPAD 502 units), wet and dry biomass (g), stem diameter (mm), and yield (g plant⁻¹) were quantified. *Trichoderma* sp. HRG-060 native strain showed the highest *in vitro* mycelial inhibition (PIRC: 80.07%), due to its ability to colonize 100% of the surface of the mycelium that grew out of the pathogen in 3 d. The highest grain yield was obtained in plants with the *Trichoderma* sp. HRG-060 strain (6.13g plant⁻¹); meanwhile, the *Bacillus* sp. T442 strain created a favorable atmosphere for the highest chlorophyll production (55.45 SPAD units), as well as the greatest wet and dry biomass weight (41.73 g plant⁻¹ and 30.03 g plant⁻¹, respectively).

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: noviembre, 2016. Aprobado: mayo, 2017.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 683-695. 2017.

Key words: biological control, native strains, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

(6.13 g planta⁻¹), y la cepa de *Bacillus* sp. T442 propició la mayor producción de clorofila (55.45 unidades SPAD) y peso de biomasa húmeda (41.73 g planta⁻¹) y seca (30.03 g planta⁻¹).

Palabras clave: control biológico, cepas nativas, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *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 importante porque genera divisas al exportar casi toda su producción; este estado es el productor y exportador principal de garbanzo blanco de México (Guerrero *et al.*, 2015). En el 2013, en Sinaloa se sembraron 61 600 ha con garbanzo blanco y la producción fue 103 645 Mg (SIAP, 2014). Un factor principal que limita el éxito de la producción de este cultivo, en el mundo, es la fusariosis vascular del garbanzo ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Jiménez y Jiménez, 2011). Las pérdidas causadas por el hongo van de 10 a 40 % de la cosecha anual, y puede devastar por completo al cultivo en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Guerrero *et al.*, 2015).

Este hongo es difícil de controlar porque resiste los principales fungicidas y fumigantes, y puede permanecer en estado latente en el suelo a través de las clamidiosporas, estructuras que representan el inóculo inicial para las epidemias en los siguientes ciclos de cultivo. En Sinaloa, la fusariosis vascular del garbanzo es la enfermedad más importante (Velarde *et al.*, 2013), y el método de control principal es la aplicación de fungicidas y fumigantes al suelo. Sin embargo, algunos de estos productos pueden dañar los cultivos por efectos fitotóxicos y eliminar los organismos benéficos, ya que no son específicos. Esto y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos, así como la posible contaminación difusa a los cuerpos de agua subterráneos, causan la búsqueda y establecimiento de alternativas ecológicas de manejo de esta enfermedad. Por lo tanto, es importante identificar y estudiar cepas de microorganismos antagonistas nativos, que optimicen el éxito como agentes de biocontrol de la fusariosis

INTRODUCTION

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the second most important nourishing leguminous plant in the world, after beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Almost all the production of chickpea crops in Sinaloa, Mexico, is exported, and this generates significant revenues. Sinaloa is the country's main producer and exporter of white chickpea (Guerrero *et al.*, 2015). In 2013, 61 600 ha of white chickpea were sowed in Sinaloa, and the production reached 103 645 Mg (SIAP, 2014). All over the world, one of the main factors that limits the success of this crop production is fusarium wilt, which is caused by the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* pathogen (Jiménez and Jiménez, 2001). Losses caused by this fungi range from 10 to 40 % of the annual harvest, and can completely devastate crops, if there are favorable conditions for the development of the resulting disease (Guerrero *et al.*, 2015).

This pathogen is difficult to control, as a consequence of its resistance to major fungicides and fumigants; besides, fungi can lie dormant in the soil, through chlamydospores, structures that represent initial inoculums for the epidemics during subsequent crop cycles. Fusarium wilt is the most important disease of chickpea in Sinaloa (Velarde *et al.*, 2013), and the main control method is to apply fungicides and fumigants on the soil. However, some of these products can harm the crops due to their phytotoxic effect; they can also eradicate benefic organisms, because they are not specific. This situation—along with safety and public health problems associated with the manufacture and use of agrochemicals, as well as the potential diffuse pollution of ground water bodies—leads to the pursuit and establishment of environmentally-friendly management alternatives. Therefore, identifying and studying native antagonistic microorganisms strains are essential to optimize their success as biological control agents of the fusarium wilt of chickpea, due to their proven adaptation to the source environment.

Trichoderma spp. and *Bacillus* spp. are proposed as biological control agents, particularly against soilborne phytopathogens (Verma *et al.*, 2007). *Trichoderma* spp. uses antagonistic action mechanisms, such as mycoparasitism, lyses, antibiosis, nutrient and space competition, or

vascular del garbanzo por su probada adaptación al ambiente de origen.

Trichoderma spp. y *Bacillus* spp. se han propuesto como agentes de control biológico, en especial contra fitopatógenos del suelo (Verma *et al.*, 2007). *Trichoderma* spp. utiliza mecanismos de acción antagonista como micoparasitismo, lisis, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio o inducción de resistencia, o ambos, en el hospedero (De la Garza, 1996). *Bacillus* spp. es una bacteria promotora de crecimiento vegetal, además de tener un efecto protector contra patógenos del suelo (Butt *et al.*, 1999). El potencial de las especies del género *Bacillus* se demostró para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos (Chen *et al.*, 2006) y la fijación biológica del nitrógeno (Ooi *et al.*, 2008).

La hipótesis de este estudio fue que cepas bacterianas y fúngicas nativas son una alternativa para el control de la fusariosis vascular del garbanzo por su actividad inhibitoria frente a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y su efecto promotor de crecimiento y vigor de las plantas de garbanzo que causará un mejor rendimiento de grano. Los objetivos fueron: 1) determinar el potencial de cepas bacterianas y cepas fúngicas, nativas de Sinaloa, como agentes de biocontrol de la fusariosis vascular del garbanzo en pruebas *in vitro* y en la planta; 2) identificar el mecanismo de control de las cepas fúngicas; 3) evaluar el efecto promotor de las cepas bacterianas y fúngicas en la altura, contenido de clorofila, peso de biomasa húmeda y seca en las plantas, así como en el rendimiento de grano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los aislamientos

El aislamiento 303CS de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (número de accesión KJ000584 del GenBank) usado en el estudio fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras. Como agentes de control biológico se usaron las siguientes cepas de la colección del Centro de Ciencias de 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, previamente aisladas de campos cultivados con garbanzo y con presencia de la enfermedad (Cuadro 1).

resistencia inducción, or both, in the host (De la Garza, 1996). *Bacillus* spp. is a plant-growth promoting bacteria; additionally, it has a protecting effect against soilborne pathogens (Butt *et al.*, 1999). Antibiotic and enzyme production, solubilization of phosphates (Chen *et al.*, 2006), and biological nitrogen fixation (Ooi *et al.*, 2008) have shown the potential of the *Bacillus* species genus.

The hypothesis of this study was that native bacterial and fungal strains represent an alternative to control fusarium wilt in chickpeas, because their activities inhibit *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, and promote the growth and vigor of chickpeas, which will result in better grain yield. The objectives were as follows: 1) to determine the potential of Sinaloa's native bacterial and fungal strains as biological control agents against fusarium wilt in chickpea, by means of *in vitro* and greenhouse tests; 2) to identify the fungal strains' control mechanisms; 3) to evaluate the effect that bacterial and fungal strains have on the height, chlorophyll content, and wet and dry plant biomass weight, as well as grain yield.

MATERIALS AND METHODS

Isolates' origin

Isolate 303CS of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, race 5—GenBank access number KJ000584— used on this study was provided by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pesqueras. As biological control agents, the following strains—taken from the Centro de Ciencias de Sinaloa (CCS)

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los sitios de origen de los microorganismos de control biológico utilizados en los ensayos *in vitro* y en invernadero.

Table 1. Geographic location of the places of origin of biological control microorganisms, using *in vitro* and greenhouse tests.

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

Activación de los aislamientos

Las bacterias se cultivaron por asadas en placas Petri con medio de cultivo a base de Agar FLO (20 g mezcla de peptonas, 14 g agar-agar, 15 g K_2HPO_4 , 15 g $MgSO_4$ y 1.0 L H_2O destilada) para las cepas de *Pseudomonas*; medio de agar nutritivo para *Bacillus* (5 g peptona de gelatina, 3 g extracto de carne, 15 g agar-agar, 1 L H_2O destilada); para el crecimiento de las cepas fúngicas y la cepa de *Foc* raza 5 se usó el método de inclusión de porción (Leslie y Sumerell, 2006). Para lo anterior, discos de 1 cm de diámetro de cada cepa se colocaron en el centro de las placas Petri con medio de cultivo PDA (4.0 g infusión de papa, 20 g dextrosa, 15 g agar y pH final de 5.6 ± 0.2). Las placas se incubaron a 28 °C; las bacterias 24 h y los hongos 5 d.

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 (Ezziyyani *et al.*, 2004), en placas Petri con medio de cultivo PDA. En las confrontaciones de las cepas bacterianas frente a *Foc* raza 5, se colocó un disco de 1 cm de diámetro del fitopatógeno crecido en PDA en un extremo de la placa, y 3 d después se puso la cepa bacteriana en el centro de la placa por asada gruesa. Para las cepas fúngicas antagonistas se usó el método de porción para la siembra (Howell, 2003): en un extremo se colocó un disco de 1 cm de diámetro de *Foc* raza 5 y 5 d después se sembró al otro extremo un disco del mismo tamaño del antagonista. Las placas inoculadas fueron incubadas 7 d a 28 °C. La evaluación de la capacidad antagónica de las cepas, se determinó mediante el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), con la fórmula:

$$PICR = [(R1 - R2) / 100] \text{ (Suárez et al., 2008)}$$

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).

El grado de micoparasitismo ejercido por las cepas de *Trichoderma* se determinó con la superficie que colonizó en la caja Petri en presencia del fitopatógeno, según la escala de Bell *et al.* (1982) (Cuadro 2).

Las confrontaciones se observaron con microscopio óptico para determinar el mecanismo de antagonismo ejercido por *Trichoderma* sobre el hongo patógeno. Así mismo, se cuantificó el total de haustorios formados por las cepas de *Trichoderma* en los enfrentamientos con *Foc* a los 5 d después de la siembra,

collection— were used: bacteria of the genus *Bacillus* sp., T442, T3141 strains; bacteria of the genus *Pseudomonas* sp., T162, 7A1, and 751 strains; fungi of the genus *Trichoderma* sp., HRG-050, HRG-060, and HRG-083 strains. These strains were previously isolated in chickpea crops, infected with the disease (Table 1).

Isolate activation

Bacteria were cultured using an inoculated loop sampling method in a Petri dish. *Pseudomonas* strains were cultured in a medium based on Agar FLO (20 g peptones mix, 14 g agar-agar, 15 g K_2HPO_4 , 15 g $MgSO_4$, and 1.0 L distilled H_2O); *Bacillus* was cultured in a nourishing agar medium (5 g peptone gelatine, 3 g meat extract, 15 g agar-agar, and 1.0 L distilled H_2O); and, fungal strains and *Foc* race 5 were grown using a portion inclusion method (Leslie and Summerell, 2006). To carry out the experiments, 1 cm diameter dishes of each strain were placed on the center of the Petri plates, with a PDA culture (4.0 g potato infusion, 20 g dextrose, 15 g agar, and 5.6 ± 0.2 final pH). The plates were incubated at 28 °C, for 24 h and 5 d, for bacteria and fungi, respectively.

In vitro antagonism tests against *Foc*, race 5

Strain antagonistic activity was studied using the dual culture technique (Ezziyyani *et al.*, 2004), in Petri plates with a PDA culture medium. Confrontations between bacteria strains versus *Foc* race 5 were arranged as follows: first, a 1 cm wide phytopathogen disk grown in PDA was placed on one side of the plate; 3 d later, a bacterial strain sample was put in the center of the plate, using an inoculating loop. The portion method was used to culture antagonistic fungal strains (Howell, 2003): a 1 cm wide disk containing *Foc* race 5 was placed on one side, and, 5 d later, an antagonist disk of the same size was placed at the other end of the plate. The inoculated plates were incubated 7 d at 28 °C. The strains' antagonistic capacity was evaluated using the percentage inhibition of radial growth (PICR), using the following formula:

$$PICR = [(R1 - R2) / 100] \text{ (Suárez et al., 2008)}$$

where *PICR* is the inhibition percentage of phytopathogen mycelium growth; *R1* is the highest radial growth (pathogen-control mycelium radius); and *R2* is the lowest ratio (pathogen mycelium radius on dual culture).

The mycoparasitism degree exercised by *Trichoderma* strains was determined based on the surface of the Petri dish that it

Cuadro 2. Escala para determinar el nivel de antagonismo propuesta por Bell *et al.* (1982).
Table 2. Scale to determine the antagonism level proposed by Bell *et al.* (1982)

Grado	Escala
1	<i>Trichoderma</i> coloniza el 100 % de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno
2	<i>Trichoderma</i> coloniza dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno
3	<i>Trichoderma</i> y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie, ningún hongo domina
4	El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de <i>Trichoderma</i>
5	El fitopatógeno coloniza el 100 % de la superficie del medio y crece sobre <i>Trichoderma</i>

para lo cual se tomaron cinco muestras al azar de 1 cm² de medio de la caja Petri con la confrontación entre el antagonista y *Foc* y se observó al microscopio.

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento (Cuadro 3), cada repetición contenía una confrontación (unidad experimental). Con los datos se realizó un ANDEVA, y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) con SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

Producción del inóculo

La producción de inóculo de los microorganismos 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 tripticaseína (17 g peptona de caseína,

colonized when the phytopathogen was present, according to the scale of Bell *et al.* (1982) (Table 2).

The confrontations were observed using an optical microscope, in order to determine the antagonistic mechanism used by *Trichoderma* on the pathogen fungi. Additionally, the total amount of haustoria generated by *Trichoderma* strains during their confrontations with *Foc* were quantified 5 d after they were cultured. For this purpose, five 1-cm² samples were randomly taken from the Petri dish where the confrontation between the antagonist and *Foc* had taken place, and they were observed under the microscope.

The experimental design was completely random, with four repetitions per treatment (Table 3); each repetition contained a confrontation (experimental unit). The data were subject to an ANOVA, and to a mean comparison Tukey test ($p \leq 0.05$), using SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

Inoculum production

Microorganism inoculum production was carried out using 500 mL flasks, using a inoculating loop to sample the biological material, under aseptic conditions, inside a laminar flow bell, and using as culture medium for *Pseudomonas*: 300 mL of tryptic soy broth (17 g casein peptone, 3 g soy peptone, 5 g NaCl, 2.5 g K₂HPO₄, 2.5 g dextrose, and final pH of 7.3±0.2); for *Bacillus*: 300mL of nurturing broth was use (5 g peptone, 3 g meat extract, and final pH 6.9±0.2); 300 mL of dextrose potato agar (PDA) were used to produce *Trichoderma*. Once the flasks were inoculated with their respective strains, they were incubated during 5 d at 28 °C, stirring them at 150 rpm. After this, their content was put on 50 mL test tubes (Falcon) and they were centrifuged at 3800 rpm for 20 minutes, at room temperature; the biomass was later harvested. Then, Sinaloa 92 white chickpea seeds were treated with a 1×10⁸ ufc mL⁻¹ concentration with the bacterial strains, using the Mc Farland 139 method (Ortigoza and

Cuadro 3. Tratamientos para la evaluación del biocontrol de la marchitez en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero.

Table 3. Treatments for the evaluation of biological control of the wilt in greenhouse chickpea plants.

Tratamiento	
T1	Testigo. Semillas sin inocular
T2	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 7A1
T3	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 162
T4	Cepa <i>Pseudomonas</i> sp. 751
T5	Cepa de <i>Foc</i> raza 5
T6	Cepa <i>Trichoderma</i> HRG-050
T7	Cepa <i>Trichoderma</i> HRG-060
T8	Cepa <i>Trichoderma</i> HRG-083
T9	Cepa <i>Bacillus</i> sp. T442
T10	Cepa <i>Bacillus</i> sp. T3141
T11	Benomilo

3 g peptona de soya, 5 g NaCl, 2.5 g K_2HPO_4 , 2.5 g dextrosa y pH final de 7.3 ± 0.2); para *Bacillus* se empleó 300 mL de caldo nutritivo (5 g peptona, 3 g 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). Los matraces inoculados con su respectiva cepa se incubaron 5 d a 28 °C, con agitación de 150 rpm. Su contenido se colocó en tubos (Falcón) de 50 mL y centrifugó a 3800 rpm por 20 min a temperatura ambiente, y se cosechó la biomasa. Luego, semillas de garbanzo Blanco Sinaloa 92 fueron tratadas con una concentración de 1×10^8 ufc mL^{-1} con las cepas bacterianas usando el método de Mc Farland 139 (Ortigoza y Ruiloba, 1998) y la estandarización de suspensiones bacterianas se realizó por el método de turbidez. Con las cepas fúngicas, las semillas fueron tratadas a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} utilizando el método de la cámara de Neubauer (Ferron, 1981).

Experimento en invernadero

Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con 12 L de sustrato (Peat Moss). Previo a la siembra, el sustrato (esterilizado en autoclave) se inoculó con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) raza 5 con una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} . El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento (Cuadro 3); cada repetición tenía 10 macetas, y cada maceta contenía dos plantas (20 plantas por repetición). La siembra se efectuó en diciembre de 2013; el riego se realizó 15 d después de la siembra, y se empleó la solución nutritiva de Murashige-Skoog (1962).

Las variables de respuesta evaluadas fueron: vigor de la planta, estimado por el porcentaje de desarrollo y flacidez; marchitez en follaje, considerando su porcentaje de clorosis; podredumbre en raíz, evaluado en porcentaje de necrosis con escalas subjetivas de estimación visual (Cuadro 4). También se evaluó el verdor en planta mediante el contenido de clorofila de las hojas usando un SPAD 502 (Spectrum Technologies, Inc.); altura de planta (cm), desde la base del tallo hasta la parte más alta de la planta; biomasa húmeda (g); y peso de biomasa seca (g) de plantas deshidratadas en estufa a 80 °C por 24 h. Además se evaluaron diámetro de tallo (mm) mediante un vernier digital y rendimiento ($g\ planta^{-1}$) en una balanza digital.

Análisis de datos

Con los datos de porcentaje de inhibición se efectuó una prueba de normalidad y homogeneidad de varianza, y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), para lo cual se usó SAS 9.0 (SAS Institute, 2002). La prueba de Kruskal Wallis se usó para los datos obtenidos de los tratamientos en

Ruiloba, 1998). The turbidity method was used to standardize bacterial suspensions. The seeds with the fungal strains were treated with a concentration of 1×10^8 conidium mL^{-1} , using the Neubauer chamber method (Ferron, 1981).

Greenhouse experiments

Inoculated seeds were sown on pots containing 12 L of substrate (Peat Moss). Before the sowing, the substrate (sterilized in autoclave) was inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) race 5, using a 1×10^8 conidium mL^{-1} concentration. The experimental design was completely random, with five repetitions per treatment (Table 3); each repetition had 10 pots, and each pot had two plants (20 plants per repetition). The seeds were sown on December 2013; they were watered 15 d after the sowing, and Murashige-Skoog (1962) nourishing solution was used.

The following response variables were evaluated: plant vigor (development and sagging percentage of the plant); wilt (chlorophyll percentage); and root rot (necrosis percentages with subjective visual assessment scales) (Table 4). In addition, the following elements were evaluated: greenness (chlorophyll content on the leaves), using a SPAD 502 (Spectrum Technologies, Inc.); plant height (cm), from the stem base to the top of the plant; wet biomass (g); and dry biomass weight (g) of plants dehydrated in an oven at 80 °C, for 24 hours. Additionally, the stem diameter (mm) was evaluated using a digital Vernier caliper, while yield ($g\ plant^{-1}$) was calculated using a digital scale.

Data analysis

A normality and homogeneity of variance test was carried out using the inhibition percentage data; the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$), using SAS 9.0 (SAS Institute, 2002). The data obtained from the greenhouse treatments of the non-parametric variables (plant vigor, foliage wilt, and root rot), along with their replication per treatment, were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Parametric variable data (height, stem diameter, chlorophyll content, fresh weight, dry weight, and yield) were subject to an ANOVA test and a Tukey ($p \leq 0.05$) mean difference test, using SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Antagonistic activities of bacterial and fungal strains

Statistical analysis showed that *in vitro* radial growth of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) race 5

Cuadro 4. Escala subjetiva para estimar el vigor, marchitez en follaje y podredumbre de raíz en plantas de garbanzo cultivadas en invernadero.

Table 4. Subjective scale to calculate the vigor, foliage wilt, and root rot, in chickpea plants grown in greenhouses.

Escala	Vigor de planta	Marchitez en follaje	Podredumbre en raíz
1	Menos vigor 0 %	No marchitez en follaje 0 %	No necrosis 0 %
2	Ligero vigor 25 %	Área del follaje enferma 25 %	Área de raíces enfermas 25 %
3	Vigor medio 50 %	Área del follaje enferma 50 %	Área de raíces enfermas 50 %
4	Vigorosa 75 %	Área del follaje enferma 75 %	Área de raíces enfermas 75 %
5	Vigorosa 100 %	Follaje totalmente enfermo 100 %	Raíces completamente enfermas 100 %

invernadero de las variables de respuesta no paramétricas (vigor de la planta, marchitez de follaje y podredumbre en raíz), con sus réplicas por tratamiento. Para los datos de variables paramétricas (altura, diámetro de tallo, contenido de clorofila, peso fresco, peso seco y rendimiento), se realizó un ANDEVA y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) con SAS 9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antagonista de las cepas bacterianas y fúngicas

El análisis estadístico mostró que el crecimiento radial *in vitro* de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) raza 5 disminuyó ($p \leq 0.05$) de 80.07 % a 38.89 % en la evaluación frente a los microorganismos de control biológico (Cuadro 5). La mayor inhibición (80.07 %) del crecimiento radial (PICR) contra *Foc* se observó en la confrontación de la cepa HRG-060 y fue diferente ($p \leq 0.05$) al PICR de las otras cepas

diminished 80.07 % to 38.89 % ($p \leq 0.05$) when it was evaluated in relation to biological control microorganisms (Table 5). The highest *Foc* PICR (80.07 %) was observed in its confrontation with the HRG-060 strain and it was different ($p \leq 0.05$) to the PICR of other antagonist strains. On that matter, Michel-Aceves *et al.* (2005) report 16.40 % to 77.80 % inhibitions, when *in vitro* isolated native *Trichoderma* are evaluated against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and 13.10 % and 94.40 % inhibitions when are evaluated against *S. rolfsii*. With regard to bacterial strains, the highest PICR was observed in T442 strain, which had a 59.26 % inhibition of *Foc*.

Three days after inoculation, the HRG-060 *Trichoderma* strain had colonized 100 % of the surface of the medium where *Foc* had grown; HRG-050 and HRG-083 colonized the surface on the fourth day, as a result of which they held the 1st degree of antagonism in the scale of Bell *et al.* (1982). According to Guédez *et al.* (2012). This indicates that these strains are highly aggressive,

Cuadro 5. Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Foc* raza 5 frente a los microorganismos nativos.

Table 5. *In vitro* mycelial growth inhibition of *Foc* race 5 against native microorganisms.

Tratamiento	Crecimiento del patógeno (cm)	PICR (%)
<i>Trichoderma</i> sp. (HRG-050)	2.07	71.29 b
<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 diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p \leq 0.05$). ❖ Different letters indicate statistically significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$).

antagonistas. Respecto a lo anterior, Michel-Aceves *et al.* (2005) reportan inhibiciones de 16.40 % a 77.80 % al evaluar *in vitro* aislados nativos de *Trichoderma* frente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y de 13.10 % a 94.40 % para *S. rolfsii*. Respecto a las cepas bacterianas, el mayor PICR se observó en la cepa T442, la cual inhibió a *Foc* en 59.26 %.

La cepa de *Trichoderma* HRG-060 colonizó el 100 % de la superficie del medio crecido con *Foc* 3 d después de la inoculación y las cepas HRG-050 Y HRG-083 lo hicieron al cuarto día, por lo que se ubicaron en el grado 1 de antagonismo de la escala de Bell *et al.* (1982). Según Guédez *et al.* (2012). Esto indica alto grado de agresividad de las cepas y son más agresivas que las cepas de *Trichoderma* spp. (Sánchez García *et al.*, (2017), las cuales colonizaron el 100 % de la superficie del medio creciendo sobre fitopatógenos de *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* a los 10 d después de la inoculación.

Durante los enfrentamientos con *Foc*, la cepa HRG-060 formó 123 ± 15 haustorios cm^{-2} por enfrentamiento, mientras que las cepas HRG-050 y HRG-083 formaron 49 ± 12 y 58 ± 9 haustorios cm^{-2} por enfrentamiento, respectivamente. La mayor cantidad de haustorios formados por la cepa de *Trichoderma* HRG-060 permitió destacar su mayor eficiencia sobre *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, ya que facilitó la entrada en las hifas y el micoparasitismo sobre *Foc*. Esto muestra la alta capacidad de inhibición de crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma*, en especial la cepa HRG-060, que formó mayor cantidad de haustorios que las otras cepas fungicas.

El mecanismo de control ejercido por las cepas de *Trichoderma* sobre *Foc* fue por micoparasitismo: las hifas de *Trichoderma* se adhirieron sobre las hifas y fiálides de *Foc*, formaron haustorios y penetraron la hifa. Estos resultados son similares a los observados por Kexiang *et al.* (2002), quienes reportaron que el crecimiento del micelio del patógeno se suprimió por micoparasitismo.

Para *Trichoderma* hay diferentes tipos de interacción hifal como parasitismo, y se consideran una potencial como biorreguladores de hongos del suelo (Infante, 2009), como el enrollamiento y penetración de hifas de *Trichoderma* en hifas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, y penetración en hifas de *Pythium* sp. y *R. solani*. Rivero (2008) evaluó cuatro aislamientos de *Trichoderma* sobre *Alternaria padwickii*, *Bipolaris*

even more aggressive than *Trichoderma* spp. strains (Sánchez García *et al.*, 2017), which colonized 100 % of the medium where the phytopathogen of *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F. verticillioides* grew, 10 d after inoculation.

During its confrontation with *Foc*, the HRG-060 strain formed 123 ± 15 haustoria cm^{-2} per confrontation, while the HRG-050 and HRG-083 strains formed 49 ± 12 and 58 ± 9 haustoria per confrontation, respectively. The highest amount of haustoria formed by the *Trichoderma* HRG-060 strain highlighted its higher efficiency against *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, since it facilitated the entrance of hyphae and the micoparasitism of *Foc*. This proves that *Trichoderma* strains have a high mycelial growth inhibition capacity, particularly strain HRG-060 which formed more haustoria than the other fungal strains.

The control mechanism exercised by *Trichoderma* strains over *Foc* was the result of micoparasitism: *Trichoderma's* hyphae stuck to *Foc's* hyphae and phialides, formed haustoria, and penetrated the hypha. These results are similar to those observed by Kexiang *et al.* (2002) who reported that micoparasitism eliminated the pathogen's mycelial growth.

There are different types of hypha interaction for *Trichoderma* (such as parasitism), and they are considered to be potential bioregulators of soil fungi (Infante, 2009): *Trichoderma* hyphae coil up and penetrate *F. oxysporum* f. sp. *cubense* and penetrate *Pythium* sp. and *R. solani* hyphae. Rivero (2008) evaluated four *Trichoderma* isolates against *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, and *Phoma* sp., and found out that it had a high competitive capacity, with two or more kinds of hypha interaction, except in the case of *Phoma* sp.

Protective effect of biological control microorganisms

The *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* isolate used in our study is highly aggressive: it causes a 93.27 % rot in the positive control plant roots (Table 6).

The vigor of T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) treatment plants was greater than with other treatments (Table 6); meanwhile T3 (*Pseudomonas* sp. T162) plants showed the lowest vigor ($p \leq 0.05$). In the case of other treatments, the plants showed

oryzae, *Curvularia lunata* y *Phoma* sp. y obtuvo una alta capacidad competitiva, con dos o más tipos de interacción hifal, excepto en *Phoma* sp.

Efecto protector de los microorganismos de control biológico

El aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizado en nuestro estudio tiene una agresividad alta al ocasionar una podredumbre de 93.27 % de la raíz de las plantas de control positivo (Cuadro 6).

El vigor de las plantas del tratamiento T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) fue mayor a los otros tratamientos (Cuadro 6) y las plantas del T3 (*Pseudomonas* sp. T162) tuvieron el vigor menor ($p \leq 0.05$). En los otros tratamientos las plantas presentaron valores mayores que el testigo y el control negativo. La menor marchitez ocurrió en las plantas de los tratamientos cuyas semillas fueron inoculadas con las cepas de *Trichoderma* (T6, T7 y T8), y fue menor ($p \leq 0.05$) a la marchitez en las plantas de T5 (control positivo) y de T11 (Benomilo). El menor porcentaje de podredumbre de raíz se presentó en las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060), y fue inferior a la sintomatología presentada en las plantas de T5 (control positivo) y T11 (Benomilo) en 41 y 19 % respectivamente (Cuadro 6). Asimismo, la presencia de la enfermedad en las plantas de T2, T6, T8, T9 y T10 fue similar al presentado en las plantas de T11 e inferior a T5 (Cuadro 6).

El mayor efecto protector contra la fusariosis vascular en el bioensayo en invernadero fue con

higher values than control and negative control. Treatment plants whose seeds were inoculated with *Trichoderma* (T6, T7, and T8) showed lower wilt, but they were less wilted ($p \leq 0.05$) than T5 (positive control) and T11 (Benomyl) plants. The lower root rot percentage occurred in T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) plants, and it was 41 % and 19 % lower than the symptomatology showed by T5 (positive control) and T11 (Benomyl) plants, respectively (Table 6). Additionally, the presence of the disease in T2, T6, T8, T9, and T10 plants was similar to its presence in T11 plants, and lower than in T5 plants (Table 6).

The greatest protective effect against fusarium wilt in the greenhouse bioassay was provided by the *Trichoderma* HRG-060 strain treatment (Table 5), which also had the best PICR (80.07 %). The PICRs of the HRG-050 and HRG-083 strains were 71.29 and 67.13 %, respectively, but there was no beneficial protective effect in chickpea plants inoculated with *Foc*. This information does not match the recommendations made by Sánchez-García *et al.* (2017) who mention that strains with good *in vitro* control also have that effect *in vivo* in inoculated plants, and recommend *in vivo* tests as an adequate tool to estimate biological control in plants.

The good results obtained from PICR means, from *Trichoderma* native strains, can be the result of the antagonists' coadaptation with pathogen fungi, because they originated in similar climates and habitats (Andrews, 1992). Therefore, there might not have been enough recognition between *Foc* and

Cuadro 6. Efecto protector sobre la fusariosis vascular del garbanzo bajo condiciones de invernadero.
Table 6. Protective effect on the fusarium wilt of chickpeas, under greenhouse conditions.

Tratamientos	Vigor de planta (%)	Marchitez de follaje (%)	Podredumbre de raíz (%)
T1=Testigo	38.00 d	0.00 e	0.00 e
T2=7A1	59.33 c	46.00 b	46.67 c
T3=T162	34.67 d	70.00 a	92.00 a
T4=751	44.67 cd	60.67 a	61.67 b
T5= <i>Foc</i> raza 5	32.00 e	60.00 a	93.27 a
T6=HRG-050	77.33 b	22.00 d	49.33 c
T7=HRG-060	87.33 a	24.00 d	33.33 d
T8=HRG-083	50.00 cd	23.33 d	56.67 c
T9=T442	60.00 c	34.67 c	56.00 c
T10=T3141	59.33 c	28.67 c	50.00 c
T11=Benomilo	64.00 c	52.20 b	51.60 c

Medias con letras diferentes en cada variable indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey; $p \leq 0.05$). ❖
Means with different letters in each variable indicate statistically significant differences (Tukey; $p \leq 0.05$).

el tratamiento de la cepa *Trichoderma* HRG-060 (Cuadro 5), la cual tuvo también el mejor PICR (80.07 %). El PICR las cepas HRG-050 y HRG-083 fue 71.29 y 67.13 %, respectivamente, pero no hubo efecto protector bueno en las plantas de garbanzo inoculadas con *Foc*. Lo anterior no coincide con la recomendación de Sanchez-García *et al.* (2017), de que las cepas con control *in vitro* bueno también lo ejercen *in vivo* en las plantas inoculadas y recomiendan que las pruebas *in vitro* son una buena herramienta de estimación del control biológico en plantas.

Los buenos resultados obtenidos de las medias de PICR, de las cepas nativas de *Trichoderma*, pueden deberse a la coadaptación de los antagonistas con los hongos patógenos, pues provenían de climas y hábitat similares (Andrews, 1992). Por lo tanto, se especula que en las pruebas en invernadero no hubo el reconocimiento suficiente entre *Foc* y las cepas de *Trichoderma* HRG-050 y HRG-083 mediante la interacción de lectinas-carbohidratos, las cuales aglutinan células que interactúan con la superficie celular del patógeno y propician micoparasitismo (Infante *et al.*, 2009), por lo cual no hubo el mismo nivel de micoparasitismo que en las pruebas *in vitro*. Lo anterior confirma que la coadaptación entre el hongo antagonista y el hongo patógeno es necesaria para realizar el control (Baker and Cook, 1974). Por ello es importante realizar las pruebas en la planta para probar el potencial verdadero de los agentes de control biológico. En todos los tratamientos el patógeno se aisló una vez más desde el tejido necrótico de todas las plantas inoculadas y se confirmó morfológicamente como la misma cepa inoculada. No se observaron síntomas en los controles no inoculados.

Promoción del crecimiento vegetal por los antagonistas bacterianos y fúngicos

Las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) fueron las más altas y superiores en 26 y 57 % con respecto a las plantas del testigo (T1) y del control positivo (T5) (Cuadro 7); el diámetro de tallo mayor se presentó en T4, T7 y T10. El contenido de clorofila en las plantas de T9 (*Bacillus* sp. T442) y T4 (*Pseudomonas* sp. 751) fue superior a los otros tratamientos ($p \leq 0.05$). El peso de la biomasa húmeda fue superior $p \leq 0.05$ en las plantas de T9 (*Bacillus* sp. T442) respecto a las del T1 (testigo), T5 (control positivo) y T11 (Benomilo). En los

Trichoderma HRG-050 and HRG-083 strains. This recognition would have occurred through the lectin-carbohydrate interaction which agglutinates cells that interact with pathogen's cell surface and created a favorable atmosphere for mycoparasitism (Infante *et al.*, 2009); therefore, the level of mycoparasitism was not the same as in the *in vitro* tests. This information confirms that coadaptation between the antagonist fungus and the pathogen fungus is required for control (Baker and Cook, 1974). Therefore, carrying out plant tests is necessary to prove the true potential of the biological control agents. In all treatments, the pathogen was once more isolated from the necrotic tissue of all inoculated plants and it was morphologically confirmed to be the same as the inoculated strain. No symptoms were observed in the non-inoculated controls.

Plant growth promotion by bacterial and fungal antagonists

Plants in T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) were the highest: 26 and 57 % higher than control plants (T1) and positive control (T5), respectively (Table 7); the greatest stem diameter was shown by T4, T7, and T10. The chlorophyll content in T9 (*Bacillus* sp. T442) and T4 (*Pseudomonas* sp. 751) plants was greater than in other treatments ($p \leq 0.05$). The wet biomass weight was higher ($p \leq 0.05$) in T9 plants (*Bacillus* sp. T442) than in T1 (control), T5 (positive control), and T11 (Benomyl). In other treatments —except T2 (*Pseudomonas* sp. 7AI) and T3 (*Pseudomonas* sp. 162)—, the wet biomass weight was greater, in relation to T1 (control) and T11 (Benomyl) plants, when T9 (*Bacillus* sp. T442) plants had a greater wet biomass weight. Likewise, dry biomass weight showed a significant increase in T9 (*Bacillus* sp. T442) plants, in relation to plants in the remaining treatments.

Plants in T9 (*Bacillus* sp. T442) had the greatest chlorophyll content, wet biomass weight, and dry biomass weight values, but T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) plants showed a significant increase ($p \leq 0.05$) in grain yield, in relation to other treatments (Table 7); there was a significant relation ($R^2=0.91$) between disease control in the plant and grain production yield. In our study, a greater (wet and dry) biomass production and a greater quantity of chlorophyll does not entail a greater grain yield. On that matter,

Cuadro 7. Efecto de la inoculación de semillas con los microorganismos bacterianos y fúngicos en los parámetros de crecimiento de plantas de garbanzo.**Table 7. Effect of inoculating seeds with bacterial and fungal microorganisms with the chickpea plant growth parameters.**

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro tallo (mm)	Clorofila (SPAD)	Biomasa húmeda (g)	Biomasa seca (g)	Rendimiento (g planta ⁻¹)
T1=Testigo	60.27c	3.76ab	44.32c	29.53bc	20.69c	3.42cd
T2=7A1	52.63d	2.86b	50.10b	26.97c	19.92c	1.82d
T3=T162	54.75d	3.10b	50.85b	28.54bc	20.32c	2.23d
T4=751	63.91c	4.26a	56.49a	33.03bc	23.75bc	3.71b
T5= <i>Foc</i> raza 5	48.35d	2.74c	43.55c	24.55d	17.84d	1.56e
T6=HRG-050	74.25a	4.04ab	48.65b	32.94bc	22.24bc	3.04d
T7=HRG-060	76.32b	4.26a	50.76b	35.57ab	26.44b	6.13a
T8=HRG-083	67.56b	4.07ab	49.36b	33.54bc	25.69b	2.94d
T9=T442	72.42ab	4.04ab	55.45a	41.73a	30.03a	3.91c
T10=T3141	72.43ab	4.26a	49.81b	33.40bc	22.19bc	3.83c
T11=Benomilo	64.06c	3.64ab	47.58b	27.59c	20.91c	3.63c

Medias con letras diferentes en cada variable son estadísticamente significativas (Tukey; $p \leq 0.05$). ❖ Means with different letters in each variable are statistically significant (Tukey; $p \leq 0.05$).

otros tratamientos, excepto T2 (*Pseudomonas* sp. 7A1) y T3 (*Pseudomonas* sp. 162), el peso de la biomasa húmeda fue mayor, respecto a las plantas de T1 (testigo) y T11 (Benomilo), donde las plantas de T9 (*Bacillus* sp. T442) obtuvieron el mayor peso de la biomasa húmeda. Así mismo, el peso de biomasa seca tuvo un aumento significativo en las plantas de T9 (*Bacillus* sp. T442) con respecto a las plantas de los otros tratamientos.

Las plantas de T9 (*Bacillus* sp. T442) tuvieron los mayores valores de contenido de clorofila, peso de biomasa húmeda y peso de biomasa seca, pero las plantas de T7 (*Trichoderma* sp. HRG-060) mostraron un aumento significativo ($p \leq 0.05$) de rendimiento de grano con respecto a los otros tratamientos (Cuadro 7) y hubo una relación significativa ($R^2 = 0.91$) entre el control de la enfermedad en la planta y el rendimiento de producción de grano. En nuestro estudio una mayor producción de biomasa (húmeda y seca) y mayor cantidad de clorofila no se traduce en mayor rendimiento de grano. Al respecto, Howell (2003) y Mohiddin *et al.* (2010) indican que las especies de *Trichoderma* durante interacciones con plantas promueven el aumento en el rendimiento en las plantas y contribuyen a la resistencia o tolerancia de enfermedades. Mohiddin *et al.* (2010) señalan que *Trichoderma* se localiza fuera y dentro de la rizósfera, donde puede colonizar y proteger las raíces. *Trichoderma* no sólo protege a la planta sino que la ayuda en su desarrollo; según Stefanova (2007), el

Howell (2003) and Mohiddin *et al.* (2010) report that *Trichoderma* species promote an increase in plant yield and contribute to disease resistance or tolerance, when they interact with plants. Mohiddin *et al.* (2010) point out that *Trichoderma* is located inside and outside the rhizosphere, where it can colonize and protect the roots. *Trichoderma* does not only protect the plant, but it also helps its development; according to Stefanova (2007), treating tobacco seeds with *Trichoderma* reduces external pollutants (such as *Rhizopus stolonifer*).

Various substances that promote plant growth are produced by certain rhizosphere microorganisms—including bacteria from the *Bacillus* genus, and fungi from the *Trichoderma* genus—and they can have a direct or indirect influence on the metabolism and physiology of the plant (Bhattacharyya and Jha, 2012), because they synthesize and excrete phytostimulant substances, such as plant growth regulators and volatile organic compounds that reinforce plant immunity (Ahmad *et al.*, 2008; Ambreen and Shahida, 2010). Therefore, studying the interaction between the *Trichoderma* HRG-060 strain and the chickpea plant and subsequently influencing greater grain yield are essential.

CONCLUSIONS

The *Trichoderma* sp. HRG-060 native strain stood out owing to its greater *in vitro* mycelial inhibition and

tratamiento de semillas de tabaco con *Trichoderma* reduce los contaminantes externos como *Rhizopus stolonifer*.

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). Por ello es importante estudiar la interacción de la cepa *Trichoderma* HRG-060 con la planta de garbanzo e inferir sobre el mayor rendimiento de grano.

CONCLUSIONES

La cepa nativa de *Trichoderma* sp. HRG-060 destacó por la mayor inhibición micelial *in vitro* y por su capacidad de colonizar el 100 % de superficie del micelio crecido del patógeno en tres días. Esta alta agresividad de la cepa fue dada por la formación de mayor número de haustorios, lo cual facilitó ejercer el micoparasitismo sobre las hifas del patógeno. Esta cepa indujo el mayor aumento del rendimiento, pero *Bacillus* sp. T442 propició la mayor producción de clorofila y peso de biomasa húmeda y seca. La cepa de *Trichoderma* sp. HRG-060 representa un agente de control biológico contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Asimismo, nuestro estudio muestra que las pruebas *in vitro* y en plantas son necesarias para identificar microorganismos con potencial de control biológico.

LITERATURA CITADA

Ahmad, F., I. Ahmad, and M. S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163: 173-81.

Ambreen, A., and H. Shahida. 2010. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure Appl. Chem.* 2: 313-319.

Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 603-635.

Baker, K. F., and J. R. Cook. 1974. *Biological Control of Plants Pathogens*. Fifth edition. CRS Press. Freeman, San Francisco, CA. USA. 157 p.

Bell D. K., H. D. Wells, and C. R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.

to its capacity to fully (100 %) colonize the surface of the mycelium that grew from the pathogen over the course of three days. The strain's high aggressiveness is the result of the formation of a greater number of haustoria, which facilitated mycoparasitism over the pathogen's hyphae. This strain induced the greater increase yield-wise, but *Bacillus* sp. T442 favored the highest production of chlorophyll and greater wet and dry biomass weight. The *Trichoderma* sp. HRG-060 strain represents a biological control agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

Likewise, our study shows that *in vitro* and plant tests are necessary to identify microorganisms with biological control potential.

—End of the English version—



Bhattacharyya, N., and K. Jha D. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.

Butt TM, Harris J, Powell K. 1999. The European scene opportunities for biopesticides. *In: Bio- Pesticides: Use and Delivery*. Volume 5. Humana Press, Totowa, N. J. pp: 23-44.

Chen, Y. P., P. D. Rekha, A. B. Arun, F. T. Shen, W. Lai, and C. C. Young. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl. Soil Ecol.* 34: 33-41.

De la Garza, J. L. 1996. *Fitopatología General*. Universidad Autónoma Nuevo León. Facultad de Agronomía. Marín, Nuevo León. 515 p.

Ezziyiani, M., C. Pérez-Sánchez, A. Sid, E. Requena M., y E. Candela M. 2004. *Trichoderma harzianum* como fungicidas para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales Biol.* 26: 35-45.

Ferron, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. *In: Burge, H. D. (ed). Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Academic. Press, London and New York. pp: 465-481.

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, Z., J. A. Acosta G., B. M. Sánchez G., P. F. Ortega M., y M. M. González C. 2015. Razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo cultivado en Guanajuato, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 38: 183-190.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87: 4-10.

Infante, D., B. Martínez, N. González, y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protec. Veg.* 24: 14-21.

- Jiménez, M., and M. M. Jiménez G. 2011. Integrated management of *Fusarium* wilt diseases. In: Alves S., F. M., and J. Díez (eds). Control of *Fusarium* Diseases. Research Signpost, Kerala, India. pp: 177-215.
- Kexiang, G., L. Xiaoguang, L. Yonghong, Z. Tianbo, and W. Shuliang. 2002. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. J. Phytopathol. 150: 271-276.
- Leslie J., F., and A. Summerell B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero S., O. Rebolledo D., R. Lezama G., R. Ariza F., y A. Barrios A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. Rev. Chapingo Serie Hortic. 11: 273-278.
- Mohiddin, F. A., M. R. Khan, S. M. Khan, and B. H. Bhat. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. Plant Pathol. J. 9: 92-102.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco cultures. Phy. Plantarum 15: 473-497.
- Ooi, T. C., A. B. Ariff, M. S. Halimi, and Z. H. Shamsuddin. 2008. Growth kinetics of diazotrophics *Bacillus sphaericus* UPMB cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. Malay. J. Microbiol. 4: 15-25.
- Ortigoza F., J., y S. L. Ruiloba L. 1998. Microbiología Práctica. Departamento de Microbiología. 2a Ed. ENCB-IPN. México. 205 p.
- Rivero, D. 2008. Identificación y control *in vitro* con quitosana y *Trichoderma* spp. de hongos que causan el manchado del grano en arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Protec. Veg. 23: 67.
- Sánchez-García, B. M., E. Espinosa-Huerta, E. Villordo-Pineda, R. Rodríguez-Guerra, M. A. Mora-Avilés. 2017. Identificación molecular y evaluación antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. Agrociencia 61: 63-79.
- SAS (Statistical Analysis System Institute). 2002. SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 27513. USA.
- SIAP. SAGARPA. 2014. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sinaloa/>. (Consulta: junio 2014).
- Stefanova, N. M. 2007. Introducción y eficacia del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. Fitosanidad 11:75-79.
- Velarde F., S., F. Zamora G., N. Valdez R., L. Cárdenas M., R. López M., J. A. Ángeles V., G. A. Fierros L., P. F. Ortega M., I. Padilla V., y E. Gutiérrez P. 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. pp: 54-64.
- Verma, M., S. K. Brar, R. D. Tyag, R. Y. Surampalli, and J. R. Valero. 2007. Review: Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochem. Eng. J. 37: 1-20.