



# Morphology and Biochemistry of Microbial Antagonists and Their Effect in the Growth of Garbanzo and Control of 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 Valdés<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

**How to cite this paper:** Oliva Ortiz, L.C., Velázquez Alcaraz, T.J., Pérez, R.S., Ruvalcaba, L.P., Valdés, T.D., Ramos, J.A. and Ortega, J.E.C. (2016) Morphology and Biochemistry of Microbial Antagonists and Their Effect in the Growth of Garbanzo and Control of Fusariosis. *Open Access Library Journal*, 3: e3226.

<http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1103226>

**Received:** November 11, 2016

**Accepted:** December 3, 2016

**Published:** December 6, 2016

Copyright © 2016 by authors and Open Access Library Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 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.

---

## Subject Areas

Plant Science

## Keywords

*Trichoderma*, *Bacillus*, *Fusarium oxysporum ciceris* Race 5, Native Strains

---

## 1. Introduction

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.), es un cultivo de gran importancia en la alimentación mundial, debido a principalmente a su alto contenido de proteína [1]; siendo la segunda leguminosa más importante del mundo después del frijol [2]. 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 [3]; llevándose a cabo su producción principalmente en la zona Noroeste del país, que comprende a Sinaloa y Sonora [4], siendo Sinaloa el principal productor y exportador de garbanzo [5]. La fusariosis vascular es la enfermedad más importante que afecta al garbanzo en todo el mundo [2], la cual reduce su rendimiento [6], y ha sido reportada en la mayoría de las zonas donde se cultiva garbanzo [2]. Uno de los principales agentes causales de esta enfermedad es *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) [7]; en el centro de Sinaloa se ha reportado a *Foc* raza 5 como el principal patógeno [8]. 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 [4]. El uso de fungicidas en el tratamiento a la semilla es una forma de reducir esta enfermedad [9]; sin embargo, ningún tratamiento químico ha proporcionado un nivel de control satisfactorio [10]. 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 [11] [12]. 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 [13]; situando así al control biológico como una alternativa dentro del manejo de enfermedades [14].

Numerosos estudios se han realizado con diversos microorganismos rizosféricos para el biocontrol de *F. oxysporum* [15] [16]; 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* [10] [11]. 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 [15] [17] [18]. La antibiosis de *Trichoderma* es por producción de sustancias como tricodermina, tricodermol, tricotoxina, dermadina [19] [20]; mientras que *Bacillus* y *Pseudomonas* producen metabolitos antifúngicos como:

iturinas, bacitracina, bacillin, subtenolin, ácido cianhídrico, entre otros [16] [21]. 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 [22] [23]. Asimismo, estos organismos son considerados como promotores del crecimiento vegetal y contribuyen a la producción de sustancias como fitohormonas, metabolitos secundarios, fitoalexinas y sideróforos [17] [22] [23]; 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 [17] [22] [23] [24].

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 [25], 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 [26].

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.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Localización Geográfica

Esta 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. Se seleccionó como parcela experimental un predio infestado fuertemente desde hace varios años por fusariosis vascular del garbanzo, en la cual se realizó un muestreo de suelo en forma al azar y un análisis de fertilidad del suelo, cuyas características se presentan en la **Table 1**, 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.

### 2.2. Activación y Caracterización de las Cepas Antagonistas Microbianas

Se realizaron ensayos *in vitro* y en campo con seis microorganismos antagonistas

**Table 1.** Análisis de fertilidad del suelo de la parcela experimental.

Análisis		Resultados	
Textura		15% arena, 16% limo, 69% arcilla	
pH		7.1	
CE		1.76 dS·m <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>-</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	3346.0	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

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 [8]. 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 papa dextrosa agar (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 [27], 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 [28]; 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 éllo 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, éstos 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 [29].

### 2.3. Confrontaciones *in Vitro*

Se realizaron bioensayos *in vitro* para determinar el efecto antagónico de las cepas por medio de la técnica de cultivo dual [30], en cajas Petri (90 x 15 mm) con medio de cultivo PDA (15 mL); un disco de 1.0 cm 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 [31]; 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 [31]. Además se contó con un testigo absoluto en caja Petri con medio PDA, se colocó a 1.0 cm del borde un disco de 5 mm de diámetro del micelio del patógeno. Se realizaron cuatro réplicas 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 [32],  $PICR = [(R1 - R2)/100]$ ; donde, PICR fue el porcentaje de inhibición en el crecimiento del micelio del fitopatógeno;  $R1$  fue el crecimiento de la colonia del patógeno-testigo; y  $R2$  el crecimiento radial de la colonia del patógeno en confrontación en cultivo dual.

### 2.4. Preparación del Inóculo Bacteriano y Fúngico

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 [33], 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> [34]. 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.

### **2.5. Ensayo de 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 semillas sólo 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 cuarto oscuro a temperatura ambiente para observar la germinación.

### **2.6. Ensayo en Campo**

El trabajo se llevó a cabo durante el ciclo 2013-2014, la siembra se efectuó en Diciembre de 2013, empleándose semillas de garbanzo variedad Blanco Sinaloa 92. 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 15 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.

### **2.7. 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. 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) medido con vernier digital, a 1.0 cm de la base del tallo; verdor de plantas en unidades del medidor Spad-502, marca Spectrum Technologies, Inc.; peso fresco y peso seco de planta (g); rendimiento (g) planta<sup>-1</sup>.

### **2.8. Análisis Estadístico**

Todos los datos se sometieron a un Análisis de Varianza, después de comprobarse su normalidad y homogeneidad, y se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) en SAS Versión 1.3.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Caracterización de Las Cepas Antagonistas

En la **Table 2** se indica la descripción morfológica de las cepas, según el Manual de Bergey's, Palleroni [35]. En base a las características presentadas, se pudo otorgar una previa distinción, para posteriormente aplicar las pruebas bioquímicas, Larrea *et al.* [36]; 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.* [37]; 7A1 y 751 se clasificaron como *Pseudomonas*, Palleroni [35]; y las cepas fúngicas se identificaron dentro del género *Trichoderma*, Kirk and Ainsworth [29].

#### 3.2. Características Microscópicas de Cepas Bacterianas

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; 7AI 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 [35]; resultados que son similares a los encontrados por Larrea *et al.* [36] para determinar el género *Bacillus*, así como por Álvarez *et al.* [38], quienes mediante esta prueba identificaron a los microorganismos empleados como *Pseudomonas*.

#### 3.3. Identificación de Las Cepas Bacterianas Mediante su Respuesta Bioquímica

La caracterización bioquímica de las bacterias se presenta en la **Table 3**, en donde se

**Table 2.** Descripción de la morfología colonial de los antagonistas microbianos.

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	Blanca	Verde	Verde
Color UV	-	-	Amarillo 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

**Table 3.** 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	-	-						

puede observar que las cepas de T3141 y T442 sólo difirieron en las pruebas con Galactoxa (GAL), N-Acetil Glucosamina (NAG) y Gentobiosa (GEN), siendo negativas para T3141 y positivas para T442. Mientras que en las cepas 751 y 7AI las diferencias se presentaron con las pruebas de Hidrólisis de la Gelatina (GEL), asimilación de Ácido Cáprico (CAP), Ácido Adípico (ADI), Citrato (CIT) y Ácido Fenil Acético (PAC); en la primera la reacción fue negativa para 7AI y positiva para 751, con las otras cuatro pruebas 7AI presentó reacciones positivas y las de 751 fueron negativas.

Los análisis de perfil bioquímico aportados por la base de datos APILAB del test API 50 CHB y API 20 NE, ayudan a caracterizar de manera fácil y rápida la fisiología de estas bacterias, Gacitúa *et al.* [39], 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 permite ubicarlos dentro de su género, Sosa *et al.* [37] y Álvarez *et al.* [38]. Mediante el empleo de los sistemas API, los microorganismos pudieron ser ubicados con un alto porcentaje de identificación (**Table 4**), aunque para la cepa T3141 dicho porcentaje fue bajo.

### 3.4. 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 [29], encontrándose micelio septado, presencia de conidióforo hialino muy ramificado, fálides individuales y en grupos, conidios ovoides, pequeños racimos terminales de color verde fuerte a verde olivo y clamidosporas intercalares típicas del género *Trichoderma*.

### 3.5. Confrontaciones *in Vitro*

El efecto antagonista *in vitro* de los agentes biocontroladores del crecimiento micelial de *F. oxysporum ciceris* se muestran en la **Table 5**. 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 7A1, que inhibieron al patógeno en 34.7% y 33.3%, respectivamente.

**Table 4.** 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

%ID = porcentaje de identificación.

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

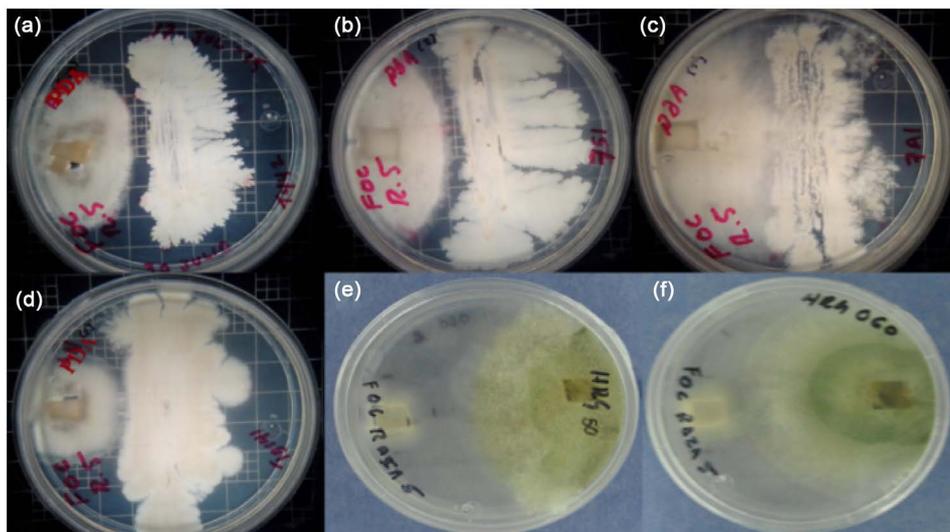
Cepas	Crecimiento del patógeno (cm)	PICR (%)
T3141	4.9	34.66 c*
T442	3.1	58.67 b
751	3.2	57.33 b
7A1	5.0	33.33 c
HRG-060	1.3	82.67 a
HRG-050	1.6	78.33 a
<i>F. oxysporum ciceris</i> raza 5	7.5	-

\*Letras diferentes en la columna indican diferencias estadísticamente significativas, según Tukey ( $P < 0.05$ ).

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.* [16] y López *et al.* [40].

Los resultados logrados con las cepas HRG-060 y HRG-050 (*Trichoderma* sp.) son muy semejantes a los obtenidos por Aponte *et al.* [41] con cepas ensayadas para el biocontrol *in vitro* de diferentes patógenos del suelo, incluido *Fusarium*; también coinciden con los de Ríos *et al.* [42], quienes reportan inhibición de crecimiento de *F. oxysporum* en más del 50% con cepas nativas de *Trichoderma* (Figure 1). 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.* [43] 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%.

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.* [11] 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.* [44] trabajaron con aislados de *Trichoderma* y *Bacillus* en confrontación con *F. oxysporum lycopersici* y reportaron que el porcentaje de inhibición del patógeno por *Trichoderma* osciló en 44.4% - 84.8%, y entre 45.1% - 63.4% al emplear aislados de



**Figure 1.** 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.

*Bacillus*. Los resultados de esta investigación también coinciden con los de Maciel *et al.* [45], 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.* [40] reportan que cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* nativas del noroeste de México tuvieron efectividad antagonista *in vitro* para control de la pudrición texana.

El biocontrol con cepas de *Trichoderma* sp. quizás se deba a la producción de enzimas, como viridina, trichodermina, tricotoxina, celobiasas, quitinasas y el compuesto 6-pentyl- $\alpha$ -pirona, que les otorga actividad antifúngica al penetrar y causar lisis del micelio de *F. oxysporum*, Martínez *et al.* [20]; 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, Infante *et al.* [17], Ezziyyani *et al.* [30] y Astorga *et al.* [46], tal como se observa en la **Figure 1**. 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 and Jha [22] y Singh and Singh [23].

### 3.6. 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 (**Table 6**); los mayores efectos se observaron con HRG-060 (*Trichoderma* sp.), T442 (*B. subtilis*) y T3141 (*B. megaterium*), los cuales superaron al testigo en 76%, 61% y 50%, respectivamente, incluso en las plantas cultivadas con HRG-060 el vigor fue significa-

**Table 6.** Protección de plantas de garbanzo por inoculación de semillas con cepas antagonistas contra la fusariosis vascular en condiciones de campo.

Cepas	Vigor de planta (%)	Marchitez de follaje (%)	Cáncer en raíz (%)
Testigo	45.13 d*	64.20 ab	81.80 a
Benomilo	62.73 bc	64.13 ab	74.73 ab
7A1	66.40 b	51.40 cd	65.67 bc
T442	72.73 ab	48.87 d	62.40 bc
751	51.40 cd	65.80 ab	83.00 a
T3141	67.80 ab	61.60 bc	77.13 a
HRG-050	44.00 d	75.27 a	82.80 a
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 ( $P < 0.05$ ).

tivamente mayor que el expresado por aquéllas tratadas con el producto Benomilo (testigo químico). 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. 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.

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.* [10], Moradi *et al.* [11], Manjunatha *et al.* [47] y Verma *et al.* [48]. De la misma manera, estos antagonistas han sido empleados en otros cultivos para protegerlos del ataque de fitopatógenos; al respecto, Arcos y Zúñiga [49] 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.* [50] 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.* [51] 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.* [30]. 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.* [52] y Lee *et al.* [53]. Por su parte, Orberá *et al.* [54] 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.* [46] 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*.

### 3.7. Efecto Estimulador del Crecimiento Vegetal Por Las Cepas Antagonistas

La germinación de semillas inoculadas con las cepas antagonistas (Table 7) 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 [55], 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.* [56], Chavarría y Carmona [57], quienes reportan incrementos significativos en la tasa de emergencia de soya y melina al emplear estos

**Table 7.** Efecto en la germinación por la inoculación a las semillas de garbanzo con las cepas antagonistas.

Cepa	Germinación de semillas (%)
Testigo	40.0 d
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
C.V.	7.0

\*Letras diferentes en la columna indican diferencias estadísticas significativas, Tukey ( $P < 0.05$ ).

microorganismos como inoculo en las semillas. Por su parte, Shahid *et al.* [58], 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 gibberelinas, citoquininas y ácido indolacético, las cuales estimulan la germinación de las semillas, Camelo *et al.* [59] y Sánchez *et al.* [60].

En cuanto a la altura de las plantas (Table 8), 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).

Los resultados anteriores coinciden con los de Shahid *et al.* [58] y Yadav *et al.* [61], 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 Ávila *et al.* [9] y Verma *et al.* [48], quienes reportaron incrementos del rendimiento de grano del garbanzo después de inocular semillas con el mismo hongo. Por su parte, Verma y Yavad [62] 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 [49] 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.* [63] notaron que *Bacillus* promueve notablemente el crecimiento en plantas de jengibre.

**Table 8.** 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> )
Testigo	28.0 a*	4.7 ab	45.3 bc	19.9 bc	15.5 bc	10.0 cd
Benomilo	23.5 ab	4.3 ab	42.3 c	17.9 c	14.0 c	4.4 e
7A1	20.3 b	4.3 b	51.0 a	19.6 bc	13.9 c	6.5 de
T442	28.2 a	5.1 ab	50.6 a	23.6 b	17.5 ab	17.2 b
751	26.3 ab	4.9 ab	40.6 c	20.8 bc	15.3 bc	13.0 bc
T3141	23.5 ab	5.0 ab	43.7 c	21.2 bc	15.5 bc	12.7 bc
HRG-050	25.0 ab	4.9 ab	40.9 c	17.2 c	13.6 c	4.8 e
HRG-060	28.1 a	5.4 a	51.1 a	31.2 a	20.0 a	25.6 a
C.V.	14.3	11.0	6.4	10.8	9.6	23.2

\*Letras diferentes en la columna indican diferencias estadísticas significativas, Tukey ( $P < 0.05$ ).

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 [19] [48] [61] [64]. 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 [49] [59] [60].

#### 4. Conclusiones

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, por lo que el uso de estos microorganismos en garbanzo, como biofumigantes y biofertilizantes, es promisorio bajo el contexto ambiental del centro de Sinaloa.

La inoculación de semillas con todos los aislamientos, excepto HRG-050, favoreció la germinación, y los mejores resultados se lograron al emplear como inoculo a T442, 751 y HRG-060, pero en campo las mejores respuestas se obtuvieron con HRG-060 y T442, ya que con ellos se incrementó el vigor de planta (grosor del tallo, verdor y biomasa), disminuyó la fusariosis y, en consecuencia, se incrementó el rendimiento de grano por planta.

## References

- [1] Jukanti, A.K., Gaur, P.M., Gowda, C.L. and Chibbar, R.N. (2012) Nutritional Quality and Health Benefits of Chickpea (*Cicer arietinum* L.): A Review. *British Journal of Nutrition*, **108**, S11-S26. <https://doi.org/10.1017/s0007114512000797>
- [2] Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M.M., Landa, B.B. and Navas-Cortes, J.A. (2015) Fusarium Wilt of Chickpeas: Biology, Ecology and Management. *Crop Protection*, **73**, 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.023>
- [3] FAOSTAT-Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015) Consultado en Octubre de 2015. <http://www.fao.org>
- [4] Guerrero, A.B.Z., Acosta, G.J.A., Sánchez, G.B.M., Ortega, M.P.F. and González, C.M.M. (2015) Razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en garbanzo cultivado en Guanajuato, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, **38**, 183-190.
- [5] SIAP, SAGARPA (2015) Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. Consultado en Mayo de 2016. <http://www.siap.gob.mx/avance-de-siembras-y-cosechas>
- [6] Navas-Cortés, J.A., Hau, B. and Jiménez, D.R.M. (2000) Yield Loss in Chickpeas in Relation to Development of *Fusarium* Wilt Epidemics. *Phytopathology*, **90**, 1269-1278. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1269>
- [7] Demers, J.E., Garzon, C.D. and Jimenez-Gasco, M.M. (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. *European Journal of Plant Pathology*, **139**, 303-318. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0387-8>
- [8] Velarde, F.S., Ortega, M.P.F., Fierros, L.G.A., Padilla, V.I., Gutierrez, P.E., Rodríguez, C.F.G., López, V.J.A., Acosta, G.J.A. and Garzón, T.J.A. (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. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, **6**, 735-748.
- [9] Ávila, M.J.A., Padilla, Z.G., Martínez, H.D., Rivas, S.F.J., Coronado, E.M.A. and Ortega, M.P. (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. *Biotechnia*, **17**, 3-8. <https://doi.org/10.18633/bt.v17i3.212>
- [10] Karimi, K., Amini, J., Harighi, B. and Brahamnejad, B. (2012) Evaluation of Biocontrol Potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* Wilt of Chickpea. *Australian Journal of Crop Science*, **6**, 695-703.
- [11] Moradi, H., Brahamnejad, B., Amini, J., Siosemardeh, A. and Haji-Allahverdiipoor, K. (2012) Suppression of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* Wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. *Plant Omics Journal*, **5**, 68-74.
- [12] Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A. and Hossain, K. (2014) *Trichoderma* spp.: A Biocontrol Agent for Sustainable Management of Plant Diseases. *Pakistan Journal of Botany*, **46**, 1489-1493.
- [13] Pastrana, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Aguado, A., Akdi, K. and Capote, N. (2016) Biological Control of Strawberry Soil-Borne Pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, Using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, **55**, 109-120.
- [14] Abdulkareem, M., Aboud, M.H., Saood, M.H. and Shibly, K.M. (2014) Antagonistic Activity of Some Plant Growth Rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. *International Journal of Phytopathology*, **3**, 49-54.

- [15] Hernández, R.A., Ruíz, B.Y., Acebo, G.Y., Miguélez, S.Y. and Heydrich, P.M. (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**, 11-19.
- [16] Eshetu, B., Amare, A. and Seid, A. (2015) Antagonistic Effect of Native *Bacillus* Isolates against Black Root Rot of Faba Bean. *African Crop Science Journal*, **23**, 249-259.
- [17] Infante, D., Martínez, B., González, N. and Reyes, Y. (2009) Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, **24**, 14-21.
- [18] Melnick, R.L., Suárez, C., Bailey, B.A. and Backman, P.A. (2011) Isolation of Endophytic Endospore-Forming Bacteria from *Theobroma cacao* as Potential Biological Control Agents of Cacao Diseases. *Biological Control*, **57**, 236-245.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.03.005>
- [19] Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L. and Lorito, M. (2008) A Novel Role of *Trichoderma* Secondary Metabolites in the Interactions with Plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **72**, 80-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- [20] Martínez, B., Infante, D. and Reyes, Y. (2013) *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, **28**, 1-11.
- [21] Ruiz, S.E., Cristóbal, A.J., Reyes, R.A., Tun, S.J., García, R.A. and Pacheco, A.J. (2014) *In Vitro* Antagonistic Activity of *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Soils of the Yucatan Peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Experimental Botany*, **83**, 45-47.
- [22] Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. (2012) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**, 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- [23] Singh, J.S. and Singh, D.P. (2013) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Microbes in Sustainable Agriculture. In: Malik, A., Grohmann, E. and Alves, M., Eds., *Management of Microbial Resources in the Environment*, Springer, Berlin, 361-385.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5931-2_14)
- [24] Cano, M.A. (2011) Interacción de microorganismos benéficos en plantas: *Micorrizas*, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una Revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, **14**, 15-31.
- [25] Calvo, A.J.A., Rivera, C.G., Orozco, C.S. and Orozco, R.R. (2012) Aislamiento Ezziyyani evaluación *in Vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, **23**, 225-231. <https://doi.org/10.15517/am.v23i2.6481>
- [26] Robinson-Boyer, L., Jegerb, J., Xu, M. and Jeffries, P. (2009) Management of Strawberry Grey Mould Using Mixtures of Biocontrol Agents with Different Mechanisms of Action. *Biocontrol Science and Technology*, **19**, 1051-1065.  
<https://doi.org/10.1080/09583150903289105>
- [27] Agurto, S.T. (1989) Manual de Técnicas en Microbiología. Talleres Gráficos de Imprenta L Pluma Fuente. Lima, 256 p.
- [28] Garassini, L.A. (1967) Microbiología Agrícola. Imprenta Universitaria, Maracaibo, 646 p.
- [29] Kirk, P.M. and Ainsworth, G.C. (2008) Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th Edition, CSIRO Publishing, Collingwood, 771 p.
- [30] Ezziyyani, M., Pérez, S.C., Sid, A.A., Requena, M.E. and Candela, M.E. (2004) *Trichoderma harzianum* como fungicidas para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, **26**, 35-45.
- [31] Estrella, F.S., Elorrieta, M.A., Vargas, G.C., Lopez, M.J. and Moreno, J. (2001) Selective Iso-

- lation of Antagonist Microorganisms of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens, International Organization for Biological Control (IOBC) West Palaearctic Regional Sector (WPRS), Bulletin*, **24**, 109-112.
- [32] Ko, H.S., Jin, R.D., Krishnan, H.B., Lee, S.B. and Kim, K.Y. (2009) Biocontrol Ability of *Lyso-bacter* Antibioticus HS124 against *Phytophthora blight* Is Mediated by the Production of 4-Hydroxyphenylacetic acid and Several Lytic Enzymes. *Current Microbiology*, **59**, 608-615. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9481-0>
- [33] Ortigoza, F.J. and Ruiloba, L.S.L. (1998) *Microbiología Práctica*. Departamento de Microbiología. 2nd Edition, ENCB-IPN, México, 205 p.
- [34] 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, New York, 465-481.
- [35] Palleroni, N.J. (2005) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Part B. Springer, New York, 323-370.
- [36] Larrea, I.I., Falconí, B.C. and Arcos, A.A. (2015) Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp. con actividad contra *Tetranychus urticae* Koch en cultivos comerciales de rosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, **17**, 140-148. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54291>
- [37] Sosa, L.A.I., Álvarez, R.V.P., Torres, C.D. and Casadesús, R.L. (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.
- [38] Álvarez, L.C., Osorio, V.W., Díez, G.M.C. and Marín, M.M. (2014) Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, **25**, 225-241. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15426>
- [39] Gacitúa, A., Valiente, S.F., Díaz, C.P., Hernández, K.C., Uribe, J.M.M. and Sanfuentes, V.E. (2009) Identification and Biological Characterization of Isolates with Activity Inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **69**, 526-533. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392009000400007>
- [40] López, V.B.E., Armenta, B.A.D., Hernández, V.S., Apodaca, S.M.A., Samaniego, G.J.A., Leyva, M.K.Y. and Valdez, O.A. (2015) Selección *in Vitro* e identificación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos para el control de *Phymatotrichopsis omnivora*. *Información Técnica Económica Agraria*, **111**, 310-325.
- [41] Aponte, G.Y., Salazar, L.A., Alcano, M.J., Sanabria, N.H., Guzmán, J.J. and Gámez, A.J. (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.
- [42] Ríos, V.C., Caro, C.J.M., Berlanga, R.D.I., Ruiz, C.M.F., Ornelas, P.J.J., Salas, M.M.A., Villalobos, P.E. and Guerrero, P.V.M. (2016) Identification and Antagonistic Activity *in Vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. Isolates against Common Phytopathogenic Fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **34**, 84-99.
- [43] Gajbhiye, A., Rai A.R., Meshram, S.U. and Dongre, A.B. (2010) Isolation, Evaluation and Characterization of *Bacillus subtilis* from Cotton Rhizospheric Soil with Biocontrol Activity against *Fusarium oxysporum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **26**, 1187-1194. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0287-9>
- [44] Kumar, P.D., Thenmozhi, R., Anupama, P.D., Nagasathya, A., Thajuddin, N. and Paneerselvam, A. (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. <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2011.523.531>

- [45] Maciel, C.G., Walke, C., Muniz, M.F.B. and Araujo, M.M. (2014) Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* engelm. *Revista Árvore*, **38**, 505-512. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622014000300013>
- [46] Astorga, Q.K., Meneses, M.K., Zúñiga, V.C., Brenes, M.J. and Rivera, M.W. (2014) Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Revista Tecnología en Marcha*, **27**, 82-91. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- [47] Manjunatha, S.V., Naik, M.K., Khan, M.F.R. and Goswami, R.S. (2013) Evaluation of Bio-Control Agents for Management of Dry Root Rot of Chickpea Caused by *Macrophomina phaseolina*. *Crop Protection*, **45**, 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.003>
- [48] Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N. and Jaiswal, D.K. (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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.001>
- [49] Arcos, J. and Zúñiga, D. (2016) Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas con capacidad para mejorar la productividad en papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*, **20**, 18-31.
- [50] Qualhato, T.F., Lopes, F.A., Steindorff, A.S., Brandao, R.S., Jesuino, R.S. and Ulhoa, C.J. (2013) Mycoparasitism Studies of *Trichoderma* Species against Three Phytopathogenic Fungi: Evaluation of Antagonism and Hydrolytic Enzyme Production. *Biotechnology Letters*, **35**, 1461-1468. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1225-3>
- [51] Tchameni, S.N., Ngonkeu, M.E., Begoude, B.A.D., Wakam, N.L., Owona A.D., Mbarga, J.B., Tchana, T., Tondje, P.R., Etoa, F.X. and Kuate, J. (2011) Effect of *Trichoderma asperellum* and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Cacao Growth and Resistance against Black Pod Disease. *Crop Protection*, **30**, 1321-1327. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.05.003>
- [52] Lima, O.D.R., Oliveira, L.J.M.G., Silva, M.S.B.S. and Rodrigues, A.A.C. (2014) Ação antifúngica *in Vitro* de isolados de *Bacillus* spp sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Caatinga*, **27**, 57-64.
- [53] Lee, Y.S. and Kim, K.Y. (2016) Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Phytopathology*, **164**, 29-39. <https://doi.org/10.1111/jph.12421>
- [54] Orberá, R.T.M., Serrat, D.M.J. and González, G.Z. (2009) Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*, **13**, 95-100.
- [55] Izzeddin, N.A. and Medina, T.L. (2011) Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Rev. de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo*, **15**, 8-12.
- [56] León, M., Yaryura, P.M., Montecchia, M.S., Hernández, A.I., Correa, O.S., Pucheu, N.L., Kerber, N.L. and García, A.F. (2009) Antifungal Activity of Selected Indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the Soybean Rhizosphere. *International Journal of Microbiology*, **2009**, Article ID: 572049. <https://doi.org/10.1155/2009/572049>
- [57] Chavarría, V.M. and Carmona, S.R. (2016) Efecto de microorganismos antagonistas en el control de la enfermedad denominada "Nectria" en la melina *Gmelina arborea* Roxb. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 21-29. <https://doi.org/10.18845/rfmk.v0i0.2549>
- [58] Shahid, M., Singh, A., Srivastava, M., Sachan, C.P. and Biswas, S.K. (2011) Effect of Seed Treatment on Germination and Vigour in Chickpea. *Trends in Biosciences*, **4**, 205-207.

- [59] Camelo, M., Vera, S.P. and Bonilla, R. (2011) Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Rev. Corpoica-Ciencia y Tecnol. Agropecuaria*, **12**, 159-166.
- [60] Sánchez, L.D.B., García H.A.M., Romero P.F.A. and Bonilla B.R.R. (2014) Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*, **16**, 122-128.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41077>
- [61] Yadav, J., Verma, J.P. and Tiwari, K.N. (2011) Plant Growth Promoting Activities of Fungi and Their Effect on Chickpea Plant Growth. *Asian Journal of Biological Sciences*, **4**, 291-299. <https://doi.org/10.3923/ajbs.2011.291.299>
- [62] Verma, J.P. and Yadav, J. (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.
- [63] Jimtha, J.C., Jishma, P., Arathy, G.B., Anisha, C. and Radhakrishnan, E.K. (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.
- [64] Harman, G.E. (2011) Multifunctional Fungal Plant Symbionts: New Tools to Enhance Plant Growth and Productivity. *New Phytologist*, **189**, 647-652.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03614.x>



Open Access Library

**Submit or recommend next manuscript to OALib Journal and we will provide best service for you:**

- Publication frequency: Monthly
- 9 [subject areas](#) of science, technology and medicine
- Fair and rigorous peer-review system
- Fast publication process
- Article promotion in various social networking sites (LinkedIn, Facebook, Twitter, etc.)
- Maximum dissemination of your research work

Submit Your Paper Online: [Click Here to Submit](#)

Or Contact [service@oalib.com](mailto:service@oalib.com)