UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

Unidad Regional Los Mochis
Departamento Académico de Investigación y Posgrado

Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente

Tesis:

Caracterización de aislados de *Trichoderma* spp. y su actividad antagónica contra el complejo de hongos asociados a la marchitez del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Sinaloa

PRESENTA:

Abelard Eliassaint

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN FITOPATOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

Director de Tesis:

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza

Directora de Tesis:

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sanchez

Comité revisor:

Dra. Rosa María Longoria Espinoza

Dr. Jesús Damián Cordero-Ramírez

Los Mochis, Sinaloa a septiembre de 2020

El presente trabajo de investigación titulado **"Caracterización de aislados de *Trichoderma spp.* y su actividad antagónica contra el complejo de hongos asociados a la marchitez del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Sinaloa"** realizado por el **Ing. Abelard Eliassaint** con matrícula **18021368**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

COMITÉ DE TESIS:

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Director de Tesis

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez
Directora de Tesis

Dra. Rosa María Longoria Espinoza
Asesora de Tesis

Dr. Jesús Damián Cordero Ramírez
Asesor de Tesis

Los Mochis, Sinaloa, octubre de 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día _24_ del mes _noviembre_ del año _2020_, quien suscribe _AbelardEliassaint_ alumno del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (Registro CONACyT 004128) con número de matrícula _18021368_, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de _Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza y Dra. Glenda Judith Lizárraga Sanchez_ y cede los derechos del trabajo titulado "Caracterización de aislados de *Trichodermaspp.*y su actividadantagónica contra el complejo de hongos asociados a la marchitez delgarbanzo (*Cicerarietinum* L.) en Sinaloa", a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

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

Abelard Eliassaint

AbelardEliassaint

ÍNDICE

Pág

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE CUADROS

AGRADECIMIENTOS 1

RESUMEN 3

ABSTRACT 4

I. INTRODUCCIÓN GENERAL 5

1.1. JUSTIFICACIÓN 6

1.2. OBJETIVO GENERAL 7

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 7

1.4. HIPÓTESIS 7

1.5. ANTECEDENTES 8

1.6. REVISIÓN DE LITERATURA 9

1.6.1. Origen del garbanzo 9

1.6.2. Importancia del garbanzo 9

1.6.3. Principales países productores de garbanzo 9

1.6.4. Clasificación taxonómica del garbanzo 10

1.7. ENFERMEDADES DE GARBANZO 10

1.7.1. Enfermedades causadas por virus 10

1.7.2. Enfermedades causadas por nematodos 11

1.7.3. Enfermedades causadas por hongos 11

1.7.4. Control de enfermedades 13

1.8. CARACTERÍSTICAS DE *TRICHODERMA* SPP. 13

1.8.1. Principales beneficios agrícolas del *Trichoderma* spp. 14

1.8.1. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. 14

1.9. LITERATURA CITADA 16

II. ...CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. Y SU ACTIVIDAD ANTAGÓNICA CONTRA EL COMPLEJO DE HONGOS ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL GARBANZO (*CICER ARIETINUM* L.) EN SINALOA. 23

2.1. RESUMEN..... 23

2.2. ABSTRACT..... 24

2.3. INTRODUCCIÓN..... 25

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS..... 26

2.4.1. Muestreos 26

2.4.2. Aislamiento, purificación y conservación de aislados 28

2.4.3. Pruebas de antagonismo *in vitro* 28

2.4.4. Caracterización morfológica de aislados de *Trichoderma*..... 29

2.4.5. Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación 30

2.4.6. Análisis filogenético 30

2.4.7. Interacciones hifales entre antagonistas y fitopatógenos 31

2.4.8. Pruebas de antagonismo *in vivo* 31

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 34

2.5.1. Antagonismo de *Trichoderma* spp. en invernadero. 45

2.6. CONCLUSIONES..... 522

2.7. LITERATURA CITADA 533

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas y signos de las principales enfermedades en garbanzo (*Cicer arietinum* L.)..... **13**

Figura 2. Clases de severidad **33**

Figura 3. Arbol filogenetico generado con analisis de secuencias ITS, EF-1α y RPB2 de especies de *Trichoderma*. **37**

Figura 4. Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra el complejo de hongos con origen el suelo asociados a la marchitez del garbanzo..... **38**

Figura 5. Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra el complejo de hongos con origen el suelo asociados a la marchitez del garbanzo..... **39**

Figura 6. Antagonismo de cinco aislados de *Trichoderma* contra el complejo de hongos de suelo asociados a la marchitez del garbanzo **42**

Figura 7. Micoparasitismo de *Trichoderma* spp. en pruebas *in vitro*……**43**

Figura 8. Colonias de los cinco aislados de *Trichoderma* con mayor porcentaje de inhibición..... **44**

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios y lugares de recolección de suelo y/o raíces donde se obtuvieron los aislados de *Trichoderma* **..... 26**

Cuadro 2. Efectos antagonistas de aislados de *Trichoderma* en términos de % de inhibición contra hongos fitopatógenos causantes de la marchitez del garbanzo**. 34**

Cuadro 3. Variaciones en la colonia de los aislados de *Trichoderma* spp.**..... 45**

Cuadro 4. Efectos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y la supresión de la marchitez del garbanzo en variedad Blanco Sinaloa-92.**..... 46**

Cuadro 5. Efectos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y la supresión de la marchitez del garbanzo en variedad tipo Desi.**..... 48**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios** por su bendición en mi vida y mi familia, por guiarme y permitirme culminar un nuevo grado de mi desarrollo académico y adquirir nuevas experiencias.

A mis padres **Abel Eliassaint** y **Andrena Sillon** por cuidarme desde niño a pesar de todas las dificultades de la vida, por guiarme en el mundo estudiantil y apoyarme en todas las cosas de la vida cotidiana.

A mi querida esposa **Moviethe Cambreus** de **Abelard** por ser mi principal consejera para entrar a la maestría y por su gran apoyo moral y psicológico para dejar mi país y buscar este sueño logrado y cumplido.

A mi hija querida **Esther Elischama Eliassaint** por aceptar molestosamente mi ausencia durante el periodo de mis estudios de maestría.

A mi suegra **Giselle Edouard** por su oración, su apoyo moral, sus preocupaciones y sus consejos para yo seguir adelante.

A mi suegro **Francion Cambreus** por apoyarme en esta decisión de cursar un posgrado para una mejor capacitación en mi vida profesional y académica.

Agradezco al núcleo básico de la maestría por ofrecer este programa educativo tan importante en la producción agrícola al nivel mundial.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **(CONACYT)**, por disponer recursos necesarios para mi manutención y pago de la colegiatura.

Agradezco a mi director de tesis **Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza** por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza para la realización de este trabajo, así como a cada uno de los miembros de mi comité evaluador principalmente **Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez, Dra. Rosa María Longoria Espinoza, Dr. Jesús Damián Cordero Ramírez** por su gran apoyo para lograr finalizar este proyecto de investigación.

Agradezco a todos los profesores que cooperan para impartir las docencias, especialmente al **Dr. Rubén Félix Gastélum** por aceptar mi solicitud y formar parte de este prestigioso programa educativo.

A **Massiel Melisa Magaña** y **Jessica Lourdes Ruiz García** por disponer siempre su tiempo y su apoyo durante el período académico.

A todos mis compañeros y amigos de la maestría, por su actitud positiva en el compañerismo.

Agradezco a mi amigo **Juan Luis Pérez Mora** por su gran apoyo y su lealtad en la amistad durante los dos años académicos.

A mi amiga **Karla Acosta Pineda** por su amistad, compañía y su apoyo incondicional durante mi estancia en la ciudad de Los Mochis, Sinaloa.

Agradezco a **Baldenebro Valdez Juan Manuel** por su gran generosidad durante mis dos años de estancia en la ciudad de Los Mochis, Sinaloa.

RESUMEN

La marchitez, causada por un complejo de hongos con origen en el suelo como *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* afecta el sistema de producción del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en diversos países, incluyendo a México. Esta enfermedad, puede ocasionar perdidas hasta de 60%. El control de enfermedades en diversos cultivos se lleva a cabo en su mayoría por métodos químicos, los cuales perturban al medio ambiente. El objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad biológica de aislados de *Trichoderma* en semillas de dos variedades de garbanzo (Blanco Sinaloa-92 y P-22-45) en condiciones de invernadero e identificar los aislados mediante análisis morfológico y molecular. Con la técnica de cultivos duales se evaluaron 30 aislados de *Trichoderma* de los cuales *T. longibrachiatum* (FAVF335 y FAVF340), y *T. afroharzianum* (FAVF345, FAVF349, FAVF351) exhibieron los mayores porcentajes de inhibición contra el complejo de hongos con origen en el suelo, y estos se utilizaron posteriormente para los bioensayos. Las semillas de garbanzo se inocularon con cada uno de los cinco aislados de *Trichoderma* por 30 min con una concentración de 1×10^8 esporas mL^{-1} y para la cepa de *Trichoderma* comercial la dosis fue de 1.2 g L^{-1}, mientras que para el fungicida la dosis fue 0.8 mL^{-1}. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial en el cual se estudiaron 48 tratamientos con seis repeticiones por cada variedad, cada bioensayo duró 30 días. Después de establecer los bioensayos, se esperó siete días para registrar el porcentaje de germinación, 25 días para registrar la incidencia, mientras que el porcentaje de severidad se registró el último día de la prueba. *T. longibrachiatum* (FAVF335 y FAVF340), tanto *in vitro* como *in planta* mostraron el mayor control sobre el complejo de hongos con origen en el suelo asociados a la marchitez del garbanzo. *In planta*, *T. longibrachiatum* (FAVF340) mostró el mayor efecto antagónico sobre los fitopatógenos para todas las variables estudiadas.

Palabras claves: *Cicer arietinum*, antagonismo, complejo de hongos, marchitez, control biológico.

ABSTRACT

The wilt, caused by a complex of fungi originating in soil such as *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* affects the production system of chickpea (*Cicer arietinum* L.) crop in various countries, including Mexico. This disease can cause losses of up to 60%. Disease control in various crops is carried out mostly by chemical methods, which disturb the environment. The objective of this research was to evaluate the biological effectiveness of *Trichoderma* isolates in seeds of two varieties of chickpea (Blanco Sinaloa-92 and P-22-45) under greenhouse conditions and identify isolates by morphological and molecular analysis. With dual cultures technique, 30 *Trichoderma* isolates were evaluated, of which *T. longibrachiatum* (FAVF335 and FAVF340) and *T. afroharzianum* (FAVF345, FAVF349, FAVF351) exhibited the highest percentages of inhibition against the complex of fungi originating in soil, and these were later used for bioassays. Chickpea seeds were inoculated with each one of five *Trichoderma* isolates for 30 min with a concentration of 1×10^8 spores mL^{-1} and for the commercial *Trichoderma* strain the dose was 1.2 g L^{-1}, while for the fungicide the dose was 0.8 mL^{-1}. A completely randomized experimental design with factorial arrangement was used which 48 treatments were studied with six repetitions for each variety, each bioassay lasted 30 days. After establishing the bioassays, we was waited seven days to record the germination percentage, 25 days to record the incidence, while the severity percentage was recorded on the last day of the test. *T. longibrachiatum* (FAVF335 and FAVF340), both *in vitro* and *in planta* showed the greatest control over the complex of fungi originating in soil associated with chickpea wilt. *In planta*, *T. longibrachiatum* (FAVF340) showed the greatest antagonistic effect on phytopathogens for all the variables studied.

Key words: *Cicer arietinum*, antagonism, fungal complex, wilt, biological control.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

México se encuentra entre los principales países productores de granos y hortalizas a nivel mundial, por ende, su economía depende en gran parte de la agricultura. El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las leguminosas que se produce en México. Para el año 2014, la India se posicionó en primer lugar con una producción de grano de garbanzo de 9,356,250 t; mientras que México se encontró en el octavo lugar con una producción de 190,803 t (Oliva *et al*., 2016). En la actualidad, se cultivan un total de 12 millones de hectáreas con garbanzo a nivel mundial y la producción promedio anual es alrededor de 12.1 millones de t (Muehlbauer y Sarker, 2017; Makonya *et al.*, 2019).

En los últimos años ha aumentado la superficie con producción de garbanzo en México, debido a la alta demanda de los mercados internacionales. Los principales estados productores son: Sinaloa, Sonora, Guanajuato, Baja California Sur y Michoacán. Sinaloa y Sonora son los dos principales estados que contribuyen a que México se encuentre entre los principales países productores de garbanzo al nivel mundial (SIAP, 2015). La producción de garbanzo en México para el ciclo otoño-invierno de 2019 fue de 90,766 ha, siendo Sinaloa el estado con mayor superficie sembrada, con un total de 50,153 ha y, con un rendimiento de 2.1 t ha^{-1} (SIAP, 2019).

Es importante mencionar, que el rendimiento del garbanzo se ve afectado por factores bióticos y abióticos, entre los bióticos se encuentran enfermedades fungosas como la marchitez del garbanzo asociada a un complejo de hongos con origen en el suelo y que representa un factor limitante para la producción de este grano. Dicha enfermedad se ha reportado en la mayoría de las zonas donde se cultivan garbanzo (Jiménez-Díaz *et al*., 2015). El tratamiento químico a la semilla es una alternativa para disminuir la incidencia y la severidad de la marchitez del garbanzo, sin embargo, no ha sido eficiente, además estas formulaciones químicas perturban los ecosistemas e inducen resistencia de fitopatógenos con el paso del tiempo, también provocan la acidificación y ocasionan la desaparición masiva de la microfauna del suelo (Oliva *et al*., 2016).

El uso de variedades resistentes y rotación de cultivo son medidas de control de la marchitez del garbanzo complementarias a los productos químicos, sin embargo, estos

métodos no han podido controlar el complejo de hongos asociados a la dicha enfermedad (Fierros *et al*., 2019). Otra alternativa de manejo de las enfermedades es la inoculación de semillas con agentes biológicos; las especies del hongo *Trichoderma* son las más utilizadas en el control biológico de fitopatógenos tanto en invernaderos como en cultivos a campo abierto debido a las ventajas que tienen. Estos hongos biocontroladores compiten por espacios, nutrientes, y secretan enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de su objetivo para luego suprimirlos (Chen *et al*., 2019).

Trichoderma spp. se han investigado ampliamente debido a la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles al beneficio de la agricultura (Mukherjee *et al*., 2013). La interacción micoparasitaria de *Trichoderma* spp. con agentes fitopatógenos está programada por señales del hospedante, lo que resulta en la producción de estructuras infecciosas y secreción de enzimas. Una vez que *Trichoderma* spp. tienen contacto con el patógeno, sus hifas a menudo se enrollan a su alrededor (Ramírez-Valdespino *et al*., 2019). En la naturaleza, los compuestos químicos de la rizosfera contribuyen en la comunicación entre las raíces de las plantas y sus microorganismos asociados. Las raíces de las plantas liberan una serie de compuestos que captan varios organismos y forman agrupaciones en la rizosfera para la protección de la planta (Oburger *et al*., 2016). Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar morfológica y molecularmente a aislados de *Trichoderma* spp., así como determinar su actividad antagónica contra el complejo de hongos asociados a la marchitez del garbanzo en Sinaloa.

1.1. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es considerado como la segunda leguminosa más importante por su aporte nutricional para consumo humano. En México, la superficie sembrada con este cultivo va en aumento debido a la alta demanda en el mercado internacional, lo que representa una iniciativa importante en la economía de los productores. El estado de Sinaloa es el principal productor en México, sin embargo, el rendimiento de este cultivo se ve afectado por diferentes enfermedades; entre ellas, la enfermedad conocida como marchitez del garbanzo, la cual esta asociada a un complejo de hongos con origen en el suelo y que representa un factor limitante en la producción.

Actualmente, el uso excesivo de productos químicos genera daños tanto al suelo como a la salud humana por lo que el presente estudio pretende contribuir con una estrategia de biocontrol para el manejo de la marchitez del garbanzo, utilizando a *Trichoderma* spp. como un agente que actúe de manera eficiente contra el complejo de hongos causantes de dicha enfermedad.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológica y molecularmente aislados de *Trichoderma* spp., así como determinar su actividad antagónica contra el complejo de hongos asociados a la marchitez del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Sinaloa.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar la capacidad antagónica de aislados de *Trichoderma* contra el complejo de hongos causantes de la marchitez en el cultivo de garbanzo en condiciones *in vitro*.

2.- Caracterizar morfológica y molecularmente a los aislados de *Trichoderma* que presenten los mejores resultados como biocontroladores en las pruebas *in vitro.*

3.- Evaluar la efectividad biológica de aislados de *Trichoderma* spp. en semillas de dos variedades de garbanzo para el control de los hongos causantes de marchitez.

1.4. HIPÓTESIS

Al menos uno de los aislados de *Trichoderma* controla de manera eficiente tanto *in vitro* como *in vivo*, al complejo de hongos con origen en el suelo asociados a la marchitez del garbanzo.

1.5. ANTECEDENTES

En la India, Saxena *et al*. (2014) identificaron varias cepas de *Trichoderma* para controlar el estrés biótico en cultivo de garbanzo y, encontraron que la inhibición de los patógenos fue más alta (82.22%) con un aislado de *T. aureoviride* contra *Sclerotinia sclerotiorum* y también mostró una inhibición alta (73.33%) contra *Sclerotium rolfsii*.

En Sinaloa, Mendoza *et al*. (2015) identificaron una cepa nativa de *Trichoderma* antagonista de *Macrophomina phaseolina* en el cultivo de frijol y de las pruebas de antagonismo, detectaron los siguientes cuatro fenómenos: competencia, antibiosis, hiperparasitismo y el retraso en el desarrollo de *T. harzianum* cuando se cultiva en competencia con *M. phaseolina*.

En Culiacán, Sinaloa, se utilizaron dos cepas de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Trichoderma* sp. para el control de fusariosis. En las pruebas *in vitro,* ellos observaron los mayores porcentajes de inhibición sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* raza 5 con los antagonistas HRG-060 y HRG-050 (*Trichoderma* spp.) y T442 y 751 (*Bacillus* sp*.* y *Pseudomonas* sp.) respectivamente Por lo que, el uso de estos microorganismos en garbanzo como biofumigantes y biofertilizantes es muy rentable para el contexto ambiental (Oliva *et al*., 2016)

En India, se identificaron morfológica y molecularmente aislados de *Trichoderma*, y encontraron que una cepa de *Trichoderma cerinum* presentó la capacidad de suprimir el marchitamiento del garbanzo causado por *F*. *oxysporum,* además de promover el crecimiento de las plantas, mayor crecimiento de raíz, así como mejor absorción de nutrientes, *T. cerinum* causó una reducción de 82.4% en la incidencia de la enfermedad comparado con el testigo (Khare *et al*., 2018).

Por su parte, Meshram *et al*. (2018) confrontaron 10 aislados de *Trichoderma* contra una cepa de *F. oxysporum* en India, y, observaron que las semillas tratadas con *Trichoderma* spp. mostraron tasa de germinación similar a las semillas del testigo. Algunos aislados indujeron un mejor crecimiento de las plantas.

1.6. REVISIÓN DE LITERATURA

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las leguminosas comestibles con mayor antigüedad y actualmente es considerado como la segunda leguminosa más importante a nivel mundial (Paul *et al*., 2018). Se conocen 43 especies del género *Cicer* de las cuales nueve son anuales y 34 son perennes (van der Maesen, 1987).

1.6.1. Origen del garbanzo

El garbanzo pertenece a la familia Fabaceae y aunque su origen no está bien determinado, es el primer cultivo domesticado en la región del Mediterráneo y Medio Oriente. India, representa aproximadamente el 75% de la producción mundial (Mahajan *et al*., 2018). Se conocen dos tipos de garbanzos, Desi (microsperma) y Kabuli (macrosperma), los cuales difieren por la morfología, el tamaño y la coloración de la semilla (Cubero, 1987; Van der Maesen, 1987; Muehlbauer y Rajesh, 2008); hoy en día se cultivan en más de 40 países y se comercializan en 140 países (Wubneh, 2016).

1.6.2. Importancia del garbanzo

El garbanzo es apreciado debido a la composición nutritiva de la semilla, ya que tiene un alto contenido de proteínas y se puede usar como un sustituto de la proteína animal (Amri-Tiliouine *et al*., 2018). El grano contiene 23% de proteínas; 40% de carbohidratos; 6% de aceite y ciertos minerales (Makonya *et al*., 2019). En México, el grano de garbanzo se consume en verde o seco, en la dieta familiar, también se usa como ingrediente de alimento en la dieta infantil (Peralta y Veas, 2014). El follaje de esta planta se usa en la alimentación de animales y contiene buena calidad de proteína (Rangel *et al*., 2011). La finalidad de la producción de garbanzo en México es para el mercado internacional y solo un 5% de esta producción se consume en México (SIAP, 2019).

1.6.3. Principales países productores de garbanzo

El garbanzo se produce en todos los continentes y los mayores productores en el mundo son India, Turquía, Pakistán, Irán, México, Australia, Canadá, Myanmar, EE. UU. y Etiopia. Mientras que los principales exportadores son Turquía, Australia, Canadá, Irán y México. La India se encuentra en primer lugar como país productor de garbanzo y a la vez importador del mismo (Muehlbauer y Sarker, 2017). El garbanzo de México se exporta a más de 52 países, siendo España, Argelia e Italia los principales socios (Manjarrez *et al*., 2004).

1.6.4. Clasificación taxonómica del garbanzo

El garbanzo es una planta herbácea anual con una altura menor a un metro, las flores son blancas o violetas, las cuales desarrollan vainas en cuyo interior se encuentran dos o tres semillas (Sajja *et al*., 2017).

Reino: Plantae.
División: Magnoliophyta.
Clase: Magnoliopsida.
Orden: Fabales.
Familia: Fabaceae
Género: *Cicer*
Especie: *Cicer arietinum*

1.7. ENFERMEDADES DE GARBANZO

El cultivo de garbanzo es atacado por varias enfermedades que representan un factor limitante para su rendimiento y la calidad de los granos. Algunas de esas enfermedades causan grandes pérdidas económicas (Jendoubi *et al*., 2017).

1.7.1. Enfermedades causadas por virus

El garbanzo está afectado por diferentes virus; sin embargo, sólo algunos causan pérdidas económicas significativas bajo condiciones ambientales favorables (Bos *et al*.,

1988; Kumar *et al*., 2008). Algunos de los virus que atacan al garbanzo son: *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Bean leafroll virus* (BLRV) y *Beet western yellows virus* (BWYV). Sin embargo, los dos más importantes son: *Chickpea chlorotic dwarf virus* (CpCDV) y *Faba bean necrotic yellow virus* (FBNY) (Figura 1A) (Makkouk *et al*., 2012).

1.7.2. Enfermedades causadas por nematodos

El cultivo de garbanzo está afectado por diferentes géneros de nematodos que pueden alcanzar el umbral (De Coninck *et al*., 2015). Los nematodos presentes con mayor frecuencia en garbanzo son: los nematodos lesionadores *(Pratylenchus* spp.), los reniformes (*Rotylenchulus reniformis*), los formadores de quistes (*Heterodera* spp.) y los que causan agallas en la raíz (*Meloidogyne* spp.). Los dos grupos más representados al nivel mundial en la producción de garbanzo son: los nematodos de los géneros *Meloidogyne* spp*.* y *Heterodera* spp. (Figura 1C) (Castillo *et al*., 2008).

1.7.3. Enfermedades causadas por hongos

Fusarium solani es uno de los hongos que causa marchitez, produciendo un cambio de color verde oscuro a verde pálido en la parte aérea de la planta. En un corte transversal del tallo se puede observar la parte central completamente obscura debido a la necrosis de los haces vasculares (Nene *et al*., 2012).

La roya, causada por *Uromyces ciceris-arietini*, es una de las enfermedades que, cuando se presenta tempranamente, es capaz de destruir lotes en pleno desarrollo. Se presenta en forma de pústulas en el envés de la hoja con una coloración rojo ladrillo y un polvito del mismo color (Figura 1D) (Stuteville *et al*., 2010).

La rabia del garbanzo, causada por *Ascochyta rabiei*, es considerada como la enfermedad más peligrosa en el clima mediterráneo, afecta todas las partes de la planta y puede causar enormes pérdidas en la producción, (Figura 1B-E) (Morales y García, 2004; Paredes-Escalante *et al*., 2009).

El moho gris, causado por *Botrytis cinerea*, provocó una epifitiología en cultivo de garbanzo en México y en toda el área productora de garbanzo en el ciclo 1991-92. La mayor severidad de la enfermedad se manifestó en alta humedad, afectando en cualquier etapa de desarrollo del cultivo. Los síntomas observados fueron aborto de flores, necrosis y tizón de hojas, dando la planta una apariencia de quemadura (Nene *et al*., 2012).

La principal enfermedad del garbanzo que se ha registrado en el estado de Sinaloa es la marchitez del garbanzo, causada por un complejo de hongos con origen en el suelo y su principal forma de penetración es por la raíz. Esta enfermedad se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de garbanzo en el estado (Figura 1F). Los patógenos involucrados en este complejo son: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum,* los cuales se pueden encontrar de forma individual y cada uno de ellos es capaz de causar la muerte a la planta; en asociación causan mayores pérdidas en menor tiempo (Morales y García, 2004; Paredes-Escalante *et al*., 2009).

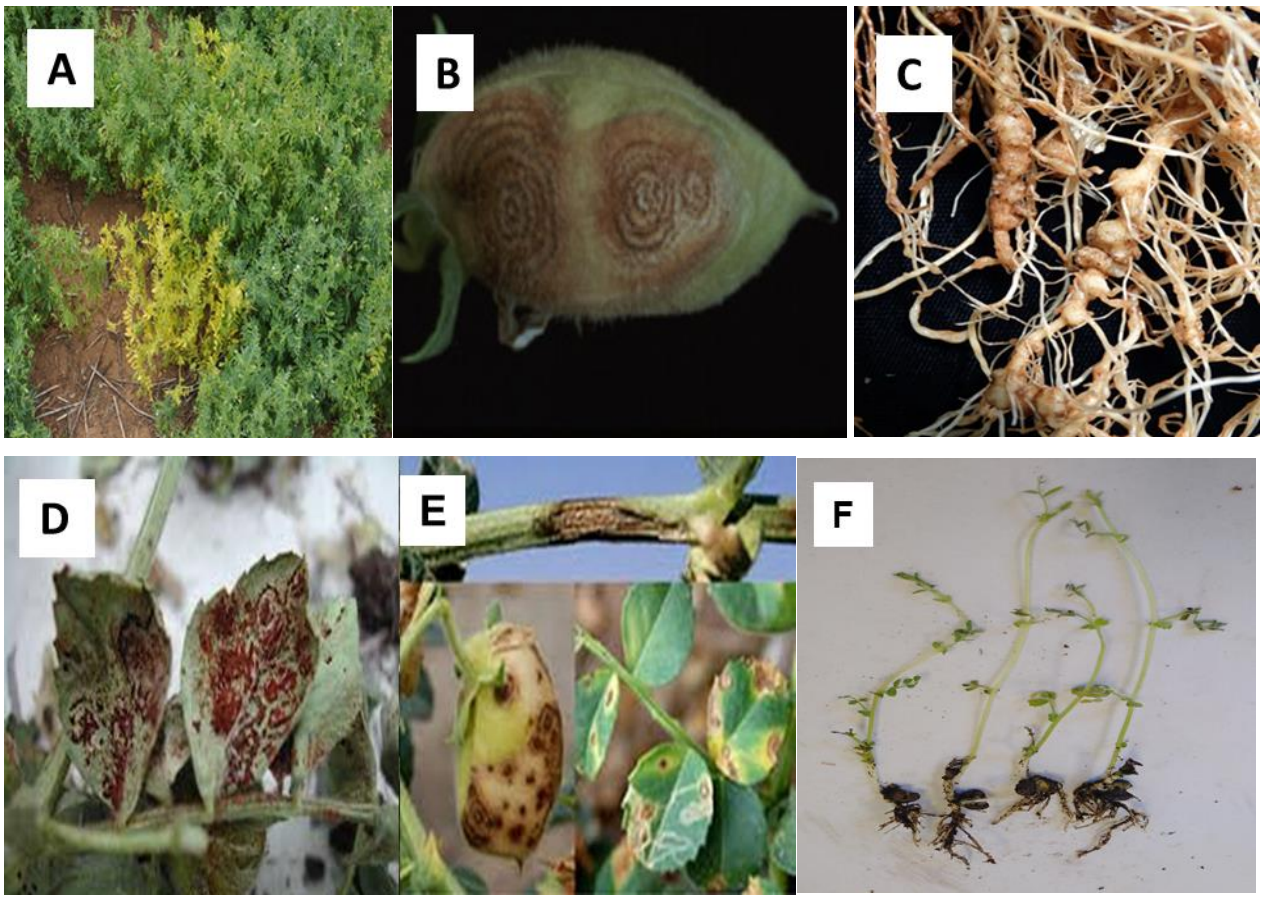


Figura 1.- Síntomas y signos de las principales enfermedades en garbanzo (Cicer arietinum L.). (A) Amarillamiento y enanismo causado por *Chickpea yellow dwarf virus* (Makkouk *et al*., 2012). **(B-E)** La rabia del garbanzo inducida por *Ascochyta rabiei* (Morales y García, 2004; Paredes-Escalante *et al*., 2009). **(C)** Agallas de *Meloidogyne incognita* (Castillo *et al*., 2008). **(D)** Roya por *Uromyces ciceris-arietini* (Stuteville *et al*., 2010). **(F)** Marchichamiento por infección de hongos con origen en el suelo.

1.7.4. Control de enfermedades

El combate de enfermedades es difícil por la complejidad de su agente causal, un método puede desfavorecer el desarrollo de un género y favorecer a otro, por lo que su control se enfoca hacia un manejo integrado donde se involucran las labores culturales, mejoramiento genético y uso de productos químicos (Muñoz-Cabañas *et al*., 2005). El control químico es el método más utilizado para controlar las enfermedades; sin embargo, en los últimos años el control biológico representa una alternativa para el control de esos patógenos (Omar *et al*., 2006; Basco *et al*., 2017). En el caso de las labores culturales, se recomienda una buena nivelación del suelo con riego controlado para evitar los encharcamientos y un programa de rotación de cultivos por tres a cinco años.

1.8. CARACTERÍSTICAS DE *TRICHODERMA* SPP.

Trichoderma spp. se caracterizan por su rápido crecimiento, las colonias son de color blanco en su inicio, que se tornan a verde claro o intenso, amarillo claro o intenso con esporulación densa. Presentan formación de esporas asexuales o conidios sobre fiálides. El micelio es generalmente ralo, los conidióforos son ramificados en formas de un árbol pequeño. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Rifai, 1969; Infante *et al*., 2009).

Trichoderma spp. producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas y a su vez son fuertes antagonistas por el espacio y nutrientes frente a los fitopatógenos. Varios estudios reportan que son hongos oportunistas manteniendo relaciones simbióticas con

las plantas y se multiplican asexualmente con la producción de conidios y clamidosporas, sin embargo, en algunos hábitats silvestres su reproducción se hace mediante ascosporas (Hermosa *et al*., 2011). El hongo produce tres tipos de propágulos, hifas, clamidosporas y esporas (conidios). Las esporas son las más utilizadas en programas de biocontrol (Mukherjee *et al*., 2013). Otra ventaja de las especies *Trichoderma* es la producción de metabolitos secundarios tales como xilanasas, gliotoxina, lipasas, proteasas, quitinasas, peptaiboles, terpenos, pironas, policétidos y sideróforos, los cuales son liberados en la rizósfera para el bien del cultivo y el control de los fitopatógenos (Zeilinger *et al*., 2016).

1.8.1. Principales beneficios agrícolas del *Trichoderma* spp.

Varias especies de *Trichoderma* promueven el desarrollo de las plantas a través de numerosos mecanismos. Estas aceleran la solubilidad de los nutrientes en suelo, aumentan la eficacia y el reciclaje de nutrientes, liberan agentes estimuladores del crecimiento de las plantas, inducen resistencia sistémica, protegen las semillas contra el ataque de microorganismos fitopatógenos y son consideradas como agentes para la biodegradación de agrotóxicos (Zhang *et al.,* 2018), y además son capaces de colonizar eficazmente las raíces de las plantas (Manganiello *et al*., 2018).

1.8.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Las especies de *Trichoderma* necesitan un suelo que contenga materia orgánica para realizar correctamente el control de patógenos. Los principales mecanismos implicados en la actividad de biocontrol son la competencia por espacio y nutrientes, la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas como la quitinasa y la β-1,3-glucanasa. Estas enzimas hidrolíticas degradan parcialmente la pared celular de los patógenos y llevan a cabo su función de parasitismo. *Trichoderma* spp. suelen producir hifas alrededor de los patógenos, por lo tanto, inactivan las enzimas de ellos (Rai *et al*., 2016); en asociación con la planta desencadenan una resistencia sistémica mejorando el crecimiento y el

desarrollo de las raíces, la productividad, la resistencia al estrés abiótico, la absorción y el uso de nutrientes (Contreras-Cornejo *et al*., 2016).

Para la defensa de las plantas, *Trichoderma* spp. penetran la primera o segunda capa de la célula epidérmica en el tejido de la raíz, colonizan los espacios y crecen entre la membrana plasmática y la pared celular de la planta (Nogueira-Lopez *et al*., 2018). Esta colonización promueve el crecimiento de las plantas, participa en la obtención de biomasa, genera una mayor germinación de las semillas y modifica la arquitectura de la raíz, aumentando la productividad (Salas-Marina *et al*., 2015). Además de modular los niveles de las hormonas producidas por la planta; *Trichoderma* spp. son capaces de contribuir con sus propias hormonas (Guzmán-Guzmán *et al*., 2019).

1.9. LITERATURA CITADA

Amri-Tiliouine W, Laouar M, Abdelguerfi A, Jankowicz-Cieslak J, Jankuloski L & Till BJ. 2018. Genetic variability induced by gamma rays and preliminary results of low-cost tilling on M2 generation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Frontiers *in Plant* Science 9: 1568 Doi:10.3389/fpls.2018.01568.

Basco MJ, Bisen K, Keswani C, Singh HB. 2017. Biological management of *Fusarium* wilt of tomato using biofortified vermicompost. Mycosphere 8: 467–483. Doi: 10.5943/mycosphere/8/3/8.

Bos L, Hampton RO, and Makkouk KM. 1988. “Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea,” in World Crops: Cool Season Food Legumes, ed R J. Summerfield (Dordrecht: Springer) 591–615 pp.

Castillo P, Navas-Cortés JA, Landa BB, Jiménez-Díaz RM and Vovlas N. 2008. Plant-parasitic nematodes attacking chickpea and their *in planta* interactions with rhizobia and phytopathogenic fungi. Plant Disease 92: 840–853. Doi: 10.1094/PDIS-92-6-0840.

Chen S, Ren J, Zhao H, Wang X, Wang T, Jin S, Ahammed GJ. 2019. *Trichoderma harzianum* improves defense against *Fusarium oxysporum* by regulating ROS and RNS metabolism, redox balance and energy flow in cucumber roots. Phytopathology 109(6): 972–982. Doi: 10.1094/phyto-09-18-0342-r.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E & Larsen J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS Microbiology Ecology 92(4): fiw036. Doi: 10.1093/femsec/fiw036.

Corby R. 1981. Seeds of Leguminosae. In Advances in legumes systemics. Part 2 (Polhill, R.M., and Raven, P.H., Eds.). Kew, UK: Royal Botanic Gardens. Pages 913–915.

Cubero JI. 1987. Morphology of chickpea. In The chickpea (Saxena. M.C. and Singh. K.B. 677 eds.). Wallingford. Oxon. UK: CAB International 35– 66.

De Coninck B, Timmermans P, Vos C, Cammue BPA and Kazan K. 2015. What lies beneath: belowground defense strategies *in plants*. Trends *in Plant* Science 20(2): 91–101. Doi:10.1016/j.tplants.2014.09.007.

Fierros LG, Ortega MP, Acosta GJ, Padilla VI, Valenzuela HV, Jiménez HY & López GJ. 2017. Respuesta del rendimiento de genotipos de garbanzo blanco a la sequía terminal. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas *8*(5): 1143–1154. https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.114.

Flores-Moctezuma HE, Montes-Belmont R, Jiménez-Pérez A and Nava-Juárez R. 2006. Pathogenic diversity of *Sclerotium rolfsii* isolates from Mexico, and potential control of southern blight through solarization and organic amendments. Crop Protection 25(3): 195–201. Doi:10.1016/j.cropro.2005.04.007.

Guzmán-Guzmán P, Porras-Troncoso MD, Olmedo-Monfil V, Herrera-Estrella A. 2019. *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. Phytopathology 109(1): 6–16. Doi: 10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW

Jendoubi W, Bouhadida M, Boukteb A, Béji M, Kharrat M. 2017. *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. Agriculture 7: 23. Doi: 10.3390/agriculture7030023.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I and Monte E. 2011. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158(1): 17–25. Doi:10.1099/mic.0.052274-0

Holm T. 1920. A morphological study of *Cicer arietinum*. Botanical Gazette 70: 446–452.

Infante D, Martínez B, González N & Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* Frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal 24(1): 14–21.

Jiménez-Díaz RM, Castillo P, Jiménez-Gasco M del M, Landa BB & Navas-Cortés JA. 2015. *Fusarium wilt* of chickpeas: Biology, ecology and management. Crop Protection 73: 16–27. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.023.

Kashyap PL, Rai P, Srivastava AK & Kumar S. 2017. *Trichoderma* for climate resilient agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33(8): 155. Doi: 10.1007/s11274-017-2319-1.

Khare E, Kumar S & Kim K. 2018. Correction to: Role of peptaibols and lytic enzymes of *Trichoderma cerinum* Gur1 in biocontrol of *Fusarium oxysporum* and chickpea wilt. Environmental Sustainability 303(1): 39–47. Doi: 10.1007/s42398-018-0022-2.

Kumar PL, Kumari SMG and Waliyar F. 2008. "Virus diseases of chickpea," in characterization, diagnosis & management of plant viruses, Vol. 3: vegetable and pulse crops, eds G. P. Rao, P. L. Kumar, and R. J. Holguín-Peña (Houston, TX: Studium Press LLC). 213–234 pp.

Makonya GM, Ogola JBO, Muthama MA, Crespo O, Maseko S, Valentine AJ. Chimphango SBM. 2019. Chlorophyll fluorescence and carbohydrate concentration as field selection traits for heat tolerant chickpea genotypes. Plant Physiology and Biochemistry 141: 172–182. Doi:10.1016/j.plaphy.2019.05.031.

Makkouk K, Pappu H and Kumari SG. 2012. Virus diseases of peas, beans, and faba bean in the Mediterranean region. Advences in Virus Research 84: 367–402. Doi: 10.1016/B978-0-12-394314-9.00011-7.

Manganiello G, Sacco A, Ercolano MR, Vinale F, Lanzuise S, Pascale A, Woo SL. 2018. Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. Frontiers in Microbiology 9: 1966. Doi:10.3389/fmicb.2018.01966.

Manjarrez SP, Gómez GRM, Salinas PRA y Armenta SLL. 2004. Blanco Sinaloa-92: Caso exitoso del mejoramiento genético de garbanzo en Sinaloa. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-C.E. Valle de Culiacán. Folleto para productores Núm. 52. 21 p.

Mendoza JL, Pérez MI, Prieto JM, Velásquez JD, Olivares JG and Langarica HR. 2015. Antibiosis of *Trichoderma* spp. strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Brazilian Journal of Microbiology 46(4): 1093–1101. https://doi.org/10.1590/S1517-838246420120177.

Meshram S, Patel JS, Yadav SK, Kumar G, Singh DP, Singh HB & Sarma BK. 2018. *Trichoderma* mediate early and enhanced lignifications in chickpea during *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infection. Journal of Basic Microbiology 59(1): 74–86. Doi:10.1002/jobm.201800212.

Morales GJA, García RJ. 2004. Enfermedades. *In*: Morales, G.J.A., Durón, N.L.J., Martínez, D.G., Núñez, M.D.J.H., Fu, C.A.A. (eds.). El Cultivo de Garbanzo Blanco en Sonora. Libro Técnico Núm. 6. INIFAP, Campo Experimental Costa de Hermosillo, Sonora, México. pp. 225-243.

Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M and Kenerley CM. 2013. *Trichoderma* research in the genome era. Annual Review of Phytopathology 51(1): 105–129. Doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102353.

Muehlbauer FJ, Sarker A. 2017. Economic importance of chickpea: production, value, and world trade. *In*: Varshney, R.K., R Thudi, M., Muehlbauer, F.J. (Eds.), The Chickpea Genome, Compendium of Plant Genomes. Springer International Publishing, pp. 05–12.

Muehlbauer FJ and Rajesh P N. 2008. Chickpea, a Common Source of Protein and Starch in the Semi-Arid ropics. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 171–186. Doi: 10.1007/978-0-387-71219-2_7

Muñoz-Cabañas RM, Hernández-Delgado S y Mayek-Pérez N. 2005. Análisis patogénico y genético de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. En diferentes hospedantes. Revista Mexicana de Fitopatología 23(1): 11–18.

Nene YL, Reddy MV, Haware MP, Ghanekar AM, Amin KS, Pande S and Sharma M. 2012. Field diagnosis of chickpea diseases and their control. Information Bulletin No. 28. Patancheru, A.P. 502 324, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 60 pp. ISBN 92-9066-199-2. Order code: IBE: 028.

Nogueira-Lopez G, Greenwood DR, Middleditch M, Winefield C, Eaton C, Steyaert JM and Mendoza-Mendoza A. 2018. The apoplastic secretome of *Trichoderma virens* during interaction with maize roots shows an inhibition of plant defence and scavenging oxidative stress secreted proteins. Frontiers *in Plant* Science 9: 409. Doi:10.3389/fpls.2018.00409.

Oburger E y Schmidt H. 2016. New methods to unravel rhizosphere processes. Trends *in Plant* Science 21(3): 243–255. Doi:10.1016/j.tplants.2015.12.005

Oliva Ortiz LC, Velazquez Alcaraz TJ, Perez RS, Ruvalcaba LP, Valdes TD, Ramos JA. and Ortega JEC. 2016. Morphology and biochemistry of microbial antagonists and their effect in the growth of garbanzo and control of fusariosis. Open Access Library Journal 12(3): e3226.

Omar I, O´Neill TM, Rossall S. 2006. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. Plant Pathology 55(1): 92–99. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01315.x.

Paredes-Escalante JE, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Sañudo-Barajas JA, Valdez-Torres JB. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27(1): 27–35 http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61211414004.

Paul P, Samineni S, Thudi, M, Sajja S, Rathore A, Das R, Gaur P. 2018. Molecular mapping of qtls for heat tolerance in chickpea. International Journal of Molecular Sciences 19(8): 2166. Doi: 10.3390/ijms19082166.

Peralta RB y Veas REA. 2014. Usos alternativos para generar valor agregado al descarte. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. 55 p.

Rai S, Kashyap PL, Kumar S. 2016. Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. Springer Plus 5(1): 1939. Doi: 10.1186/ s40064-016-3657-4.

Ramírez-Valdespino CA, Casas-Flores S and Olmedo-Monfil V. 2019. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. Frontiers in Microbiology 10: 1030 doi:10.3389/fmicb.2019.01030.

Rangel MD, Verdugo PM, Osuna ET, Báez SMA, Basilio HJ, Valdez TB, Contreras MR, Sañudo BJA y Campos SJP. 2011. Caracterización del garbanzo verde (*Cicer arietinum* L.) y tecnologías poscosecha para mantener su calidad. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(1): 39-45.

Rifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116: 1–56

Sajja SB, Samineni S and Gaur PM. 2017. Botany of chickpea. The Chickpea Genome 13–24. Doi: 10.1007/978-3-319-66117-9_3.

Salas-Marina MA, Isordia-Jasso MI, Islas-Osuna MA, Delgado-SÃ¡nchez P, JimÃ©nez-Bremont JF, RodrÃguez-Kessler M, Casas-Flores S. 2015. The Epl1 and sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. Frontiers in Plant Science 6. Doi:10.3389/fpls.2015.00077

Saxena A, Raghuwanshi R & Singh HB. 2014. *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. Journal of Basic Microbiology 55(2): 195–206. Doi:10.1002/jobm.201400317.

Sharma M, Sengupta A, Ghosh R, Agarwal G, Tarafdar A, Nagavardhini A, Varshney RK. 2016. Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. Scientific Reports 6(1): 37353. Doi: 10.1038/srep37353.

SIAP. 2015. Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. Consultado en Mayo de 2016. http://www.siap.gob.mx/avance-de-siembras-y-cosechas.

SIAP, SAGARPA. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera consultado al julio 2019. Disponible en: infosiap.siap.gob.mx › Agricola_siap › Avance Nacional Cultivo.

Stuteville DL, Graves WL, Dixon LJ, Castlebury LA and Minnis AM. 2010. *Uromyces ciceris-arietini*, the cause of chickpea rust: New Hosts in the Trifolieae, Fabaceae. Plant Disease 94(3): 293–297. Doi: 10.1094/pdis-94-3-0293.

Van der Maesen LJG. 1987. Origin, history, and taxonomy of chickpea. In M. C. Saxena and K. B. Singh (Eds.), the Chickpea. UK: CAB International Publications.

Vavilov NI. 1951. The origin variation maturity and breeding of cultivated plant. (In An annotated bibliography of chickpea Genetics and Breeding 1915.-1983.Ed. Singh. K.B.; Malhotra. R.S. and Muehlbauer. F.J. 1984.ICARDA/ICRISAT.

Wubneh WY. 2016. Biological control of chickpea pod borer, *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): a global concern. WSN 45 (2): 92–110.

Zeilinger S, Gruber S, Bansal R and Mukherjee PK. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – chemistry meets genomics. Fungal Biology Reviews 30(2): 74–90. doi:10.1016/j.fbr.2016.05.001.

Zhang F, Xu X, Huo Y and Xiao Y. 2018. *Trichoderma*-inoculation and mowing synergistically altered soil available nutrients, rhizosphere chemical compounds and soil microbial community, potentially driving alfalfa growth. Frontiers in Microbiology 9: 3241. doi:10.3389/fmicb.2018.03241.

II. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *TRICHODERMA* SPP. Y SU ACTIVIDAD ANTAGÓNICA CONTRA EL COMPLEJO DE HONGOS ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL GARBANZO (*CICER ARIETINUM* L.) EN SINALOA.

2.1. RESUMEN

La enfermedad conocida como "marchitez del garbanzo", causada por *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* es una de las principales limitantes en las áreas donde se produce garbanzo en México. En su manejo, tradicionalmente se ha utilizado el control químico, lo que ha impactado negativamente en los agroecosistemas. El control biológico es la alternativa ecológica para el manejo de las enfermedades de las plantas a través del uso de biocontroladores benéficos como hongos y bacterias. En este estudio se evaluó la capacidad antagónica de 30 aislados de *Trichoderma* spp. *in vitro* contra el complejo de hongos causantes de la marchitez del garbanzo posteriormente, se utilizaron *in vivo* los cinco aislados *T. longibrachiatum* (FAVF335), *T. longibrachiatum* (FAVF340), *T. afroharzianum* (FAVF345), *T. afroharzianum* (FAVF349) y *T. afroharzianum* (FAVF351) que presentaron mayor porcentaje de inhibición con el objetivo de caracterizar morfológica e identificar molecularmente las especies de *Trichoderma*. Los resultados de la caracterización morfológica indicaron que todos los aislados usados en este estudio pertenecen al género *Trichoderma*. Para la identificación molecular de los cinco aislados, se utilizaron los iniciadores ITS4 e ITS5. Se amplificó la región completa ITS, así como parte del gen de la subunidad grande del RNA polimerasa II (RPB2) y un fragmento del gen factor de elongación de la traducción 1-alpha (EF-1α). Para determinar la identidad de los cinco aislados de *Trichoderma* al nivel de especie, se realizó la reconstrucción filogenética mediante análisis multilocus de las secuencias ITS, EF-1α y RPB2.

Palabras claves: *Trichoderma* spp., control biológico, marchitez del garbanzo, identificación molecular.

2.2. ABSTRACT

Disease known as "chickpea wilt", caused by *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* is one of the main limitations in areas where chickpea is produced in Mexico. In its management, we have traditionally used chemical control, what has negatively impacted agroecosystems. Biological control is the ecological alternative for the management of plant diseases through the use of beneficial biocontrollers such as fungi and bacteria. In this study, the antagonistic capacity of 30 Trichoderma isolates was evaluated *in vitro* against the fungal complex that causes chickpea wilt. Subsequently, the five isolates *T*. *longibrachiatum* (FAVF335), T. *longibrachiatum* (FAVF340), *T*. *afroharzianum* (FAVF345), *T*. *Afroharzianum* (FAVF349) and *T*. *afroharzianum* (FAVF351) that presented higher percentage of inhibition were used *in vivo* in order to characterize morphologically and molecularly identify *Trichoderma* species. The results of morphological characterization indicated that all isolates used in this study belong to the genus *Trichoderma*. For the molecular identification of the five isolates, the ITS4 and ITS5 primers were used. The entire ITS region was amplified, as well as part of the RNA polymerase II large subunit gene (RPB2) and a fragment of the translation elongation factor 1-alpha gene (EF-1α). To determine the identity of the five *Trichoderma* isolates at species level, phylogenetic reconstruction was performed by multilocus analysis of the ITS, EF-1α and RPB2 sequences.

Key words: *Trichoderma* spp., biological control, chickpea wilt, molecular identification.

2.3. INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa alimenticia con más alto contenido de proteínas después del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Gaur *et al*., 2008; Varshney *et al*., 2013b). India es el mayor productor de garbanzos, con una participación de 75% de la producción mundial (Maurya y Kumar, 2018; Gaur *et al*., 2019). Esta leguminosa se cultiva en 50 países de los cuales India, Australia, Canadá, Etiopía, Irán, México, Myanmar, Pakistán, Turquía y EE. UU. son los principales productores (Gaur *et al*., 2012; Archak *et al*., 2016; Dixit *et al*., 2019). La producción de este grano enfrenta muchos desafíos de origen bióticos principalmente como los hongos, nematodos, virus y de origen abióticas como la sequía, la precipitación, el pH, las bajas y altas temperaturas (Millan *et al*., 2006; Gaur *et al*., 2008; Mantri *et al*., 2010; Jha *et al*., 2014; Garg *et al*., 2014).

La marchitez del garbanzo, causada por un complejo de hongos con origen en el suelo representa el principal factor limitante para la producción del garbanzo, y, esta enfermedad es fuertemente influenciada por las variables climáticas (Sharma, 2012). La producción de garbanzo está limitada en gran medida por el marchitamiento, el cual amenaza su permanencia en la competencia del mercado internacional (Kashiwagi *et al*., 2015). Esta enfermedad fúngica ha llevado a una reducción de la superficie sembrada en México (Fierros *et al*., 2016).

La interacción planta-patógeno es compleja e implica la expresión tanto de genes de virulencia de patógenos como genes de defensa de las plantas. Los genes de los patógenos se clasifican en función de la formación de estructuras de la infección, degradación de la pared celular, biosíntesis de toxinas, señalización y proteínas que suprimen la defensa de las plantas (Idnurm *et al*., 2001).

Las estrategias convencionales empleadas para el manejo de la marchitez del garbanzo son el uso de variedades resistentes, rotación de cultivos, solarización, uso de semillas tratadas con fungicidas químicos, sin embargo, no han tenido éxito (Landa *et al*., 2004; Paredes-Escalante *et al*., 2009). Debido a esta adversidad, el uso de métodos ecológicos es otra alternativa para la protección de los cultivos contra plagas y enfermedades con el fin de mejorar el crecimiento y la productividad de las plantas (Rawat *et al*., 2011). Entre

los agentes de control biológico, ciertas especies del género *Trichoderma* son las más conocidas por sus actividades de biocontrol e interacciones positivas con las plantas (Benítez *et al*., 2004; Nawrocka y Małolepsza, 2013). La producción de enzimas extracelulares son las propiedades efectivas de *Trichoderma* spp. en el proceso del antagonismo contra los patógenos. Sus metabolitos secundarios son de naturaleza volátil y no volátil, tales como xilanasas, gliotoxina, lipasas, proteasas, quitinasas, glucanasas b-1,3 peptaiboles, terpenos, pectinasa, pironas, policétidos y sideróforos, los cuales son liberados para producir efectos sobre el crecimiento de los patógenos (Zeilinger *et al*., 2016).

Hoy en día, varios bioplaguicidas basados en *Trichoderma* spp. están disponibles para el tratamiento de problemas fitosanitarios (Singh *et al*., 2014; Lopez-Raez *et al*., 2017; Bonanomi *et al*., 2018). El objetivo de esta investigación fue: evaluar la capacidad antagónica *in vitro* e *in vivo* de aislados de *Trichoderma* contra el complejo de hongos con origen en el suelo causantes de la marchitez del garbanzo, así como caracterizar moforlógica y molecularmente los aislados con mejor efecto antagonista.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Muestreos

Durante el ciclo 2018–2019 se recolectaron plantas de garbanzo sanas, así como con síntomas típicos de marchitez, en lotes comerciales distribuidos en diferentes municipios del estado de Sinaloa (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Sitios y lugares de recolección de suelo y/o raíces donde se obtuvieron los aislados de *Trichoderma*

Código del aislado	Municipio, Estado	Materiales	Fecha de muestreo

FAVF324	Culiacán, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF325	Culiacán, Sinaloa	Raíz	Enero 2019
FAVF326	Culiacán, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF327	Culiacán, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF328	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF329	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF330	Mocorito, Sinaloa	Raíz	Enero 2019
FAVF331	Mocorito, Sinaloa	Raíz	Enero 2019
FAVF332	Mocorito, Sinaloa	Raíz	Enero 2019
FAVF333	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF334	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF335	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF336	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF337	Mocorito, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF338	Angostura, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF339	Salvador Alvarado, Sinaloa	Suelo	Enero 2019
FAVF340	Mocorito, Sinaloa	Raíz	Enero 2019
FAVF341	Mocorito, Sinaloa	Raíz	Febrero 2019
FAVF342	Salvador Alvarado, Sinaloa	Suelo	Febrero 2019
FAVF343	Salvador Alvarado, Sinaloa	Raíz	Febrero 2019
FAVF344	Salvador Alvarado, Sinaloa	Suelo	Febrero 2019
FAVF345	Salvador Alvarado, Sinaloa	Suelo	Febrero 2019
FAVF346	Salvador Alvarado, Sinaloa	Raíz	Febrero 2019
FAVF347	Gusasave, Sinaloa	Suelo	Febrero 2019
FAVF348	Gusasave, Sinaloa	Suelo	Febrero 2019
FAVF349	Gusasave, Sinaloa	Suelo	Febrero 2019
FAVF350	Gusasave, Sinaloa	Raíz	Febrero 2019
FAVF351	Gusasave, Sinaloa	Raíz	Febrero 2019
FAVF352	Gusasave, Sinaloa	Raíz	Febrero 2019
FAVF353	Comondú, Baja California Sur	Suelo	Febrero 2019

2.4.2. Aislamiento, purificación y conservación de aislados

Los aislados de hongos se obtuvieron con el siguiente procedimiento. Se cortaron piezas de raíz con síntomas de pudrición y necrosis, se desinfestaron por inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% por 3 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, las piezas de raíz desinfestadas se colocaron en placas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA). Las placas Petri se mantuvieron en incubación a 25 °C bajo condiciones de oscuridad, por 72 h. Después, se transfirieron discos miceliales (5 mm de diámetro) del borde de los crecimientos fúngicos activos de *Trichoderma* a nuevas placas Petri con medio PDA y se incubaron a 25 °C. Un total de 30 aislados de *Trichoderma* se purificaron mediante la técnica de cultivos monospóricos, para lo cual se llevo a cabo la transferencia de esporas germinadas en medio de cultivo agua–agar (AA) a placas Petri con medio PDA fresco. En el caso de las muestras de suelo, los aislados se obtuvieron mediante el protocolo descrito por Elad y Chet. (1983). Finalmente, los 30 aislados obtenidos se depositaron en la colección de cultivos de hongos fitopatógenos de la Facultad de Agricultura del Valle de Fuerte en la Universidad Autónoma de Sinaloa (Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México) con números de acceso FAVF324−FAVF353. Los cultivos se conservaron como suspensión de esporas y/o discos miceliales en 15% de glicerol a -20 °C. Además, se conservaron a temperatura ambiente en tubos de ensayo con agua destilada doblemente esterilizada.

2.4.3. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se realizaron confrontaciones duales en cajas Petri para evaluar el efecto antagónico de los 30 aislados de *Trichoderma* contra cinco hongos patógenos de importancia económica en el cultivo de garbanzo: *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Dichos fitopatógenos fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Coordinación Regional Culiacán.

Para el ensayo, se incrementaron los aislados de *Trichoderma* y los fitopatógenos en medio PDA (Difco, EE. UU.). A partir de los hongos incrementados, se procedió a colocar un disco micelial (6 mm de diámetro) de *Trichoderma* a 1 cm de distancia del centro de la placa Petri, y a 1 cm en el extremo opuesto se colocó un disco micelial del fitopatógeno. Este procedimiento se realizó para cada aislado de *Trichoderma* y fitopatógeno, de tal manera que se confrontaron todos los aislados. Cada tratamiento tuvo cuatro replicas. Como testigo, se consideró una placa Petri con PDA donde se colocó únicamente un disco micelial del fitopatógeno (Khare *et al*., 2018). Todas las placas Petri se incubaron durante tres días a 25 ± 2 °C. El experimento completo se realizó dos veces.

Para la evaluación, se midió el crecimiento micelial radial cada 24h para todos los hongos. La evaluación terminó cuando el micelio del antagonista y patógeno estuvieron en contacto o detuvieron su crecimiento. Los porcentajes de reducción de crecimiento micelial de los fitopatógenos se calcularon con la fórmula propuesta por Saxena *et al*. (2014), considerando el promedio de crecimiento (mm) de los patógenos en las placas usadas como testigos, así como el promedio del crecimiento micelial en las placas Petri de las confrontaciones. La formula se describe a continuación: **I= (C – T)/C X 100.** Donde: I= % de inhibición del crecimiento micelial. C= Crecimiento del patógeno en la placa del testigo. T= Crecimiento del patógeno en el cultivo dual.

Los experimentos se establecieron usando un diseño completamente al azar. Los datos se expresaron como porcentaje. Con los datos obtenidos en el ensayo *in vitro* se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias (LSD, α=0.05), utilizando el paquete SAS versión 9.4.

2.4.4. Caracterización morfológica de aislados de *Trichoderma*

Para el estudio morfológico de los cinco aislados de *Trichoderma* (FAVF335, FAVF340, FAVF345, FAVF349 y FAVF351) que presentaron el mejor efecto antagónico *in vitro*, se utilizó medio de cultivo PDA en el cual se colocó un disco de 6 mm de diámetro con micelio y se incubó a 25 º C durante cuatro días. Se registraron las características de las colonias y en microscopia de luz se caracterizaron 100 conidios de cada aislado.

2.4.5. Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación

Para cada aislado de *Trichoderma* sp. se extrajo el ADN genómico de colonias de cinco días de edad en micelio PDA. Para ello, se raspó el micelio y se suspendió en solución de 800 µl/CTAB al 2% en microtubos y se maceró el micelio con un pistilo previamente esterilizado**.** Se pasaron los microtubos por vortex durante 15 s, se centrifugó por 5 min a 13000 rpm, se recuperó el sobrenadante, se transfirió a un microtubo nuevo, se agregaron 500 µl de cloroformo, se le dio un vortex por 10 s, se centrifugó por 5 min a 13000 rpm, se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 750 µl), se agregaron (350 µl) etanol absoluto frio, se dejó reposar por 10 min, se centrifugó por 5 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Después, se añadieron 500 µl de etanol al 75%, se llevó al vortex por 10 s, se centrifugó por 5 min a 13000 rpm, se descartó nuevamente el sobrenadante, se dejó reposar por 60 min, se agregaron 30 µl agua ultra pura y se centrifugó.

Para la identificación de los aislados de *Trichoderma* se amplificó la región completa ITS, así como parte del gen de la subunidad grande del RNA polimerasa II (RPB2) y un fragmento del gen factor de elongación de la traducción 1-alpha (EF-1α). Los iniciadores usados fueron los siguientes: ITS4/ITS5 (White *et al*., 1990), EF1-728F/EF1-986R (O'Donnell *et al*., 1998) y RBP2-5F/RPB2-7R (Chen y Zhuang 2016) para ITS, EF-1α y RPB2, respectivamente. Cada reacción de PCR de 26 µl consistió en 16.73 µl de H2O UP, 2.5 µl de Buffer, 0.75 µl de $MgCl^{++}$, 0.7 µl de de dNTP, 0.7 µl de cada Oligo, 0.16 de Taq polimerasa y 2 µl de ADN. La reacción del PCR se llevó a cabo en un termociclador durante 2 h. Posteriormente, se preparó un gel de agarosa al 1%, con tampón TAE 1 X 5 µL del producto de PCR y se corrió a 90 V para la electroforesis. El gel se visualizó en un espectrofotómetro (Biorad, EE. UU.). Los productos amplificados se secuenciaron en la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y se realizó un análisis filogenético con el criterio de Máxima Verosimilitud.

2.4.6. Análisis filogenético

Para determinar la identidad de los cinco aislados de *Trichoderma* a nivel de especie, se realizó la reconstrucción filogenética mediante análisis multilocus de las secuencias ITS, EF-1α y RPB2. Las secuencias forward y reverse se ensamblaron usando el paquete Staden (Staden *et al.* 1998). Las secuencias generadas en este estudio fueron suplementadas con secuencias adicionales obtenidas del GenBank, con base en BLASTn y en literatura. Los alineamientos de secuencias múltiples para cada locus independiente se llevaron acabo usando el programa MEGA 7 (Kumar *et al*. 2016), y se ajustaron manualmente cuando fue necesario. La historia evolucionaria se infirió mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo del parámetro Tamura 2. La robustez de los árboles se evaluó mediante 1000 repeticiones de bootstrap y se eliminaron todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes.

2.4.7. Interacciones hifales entre antagonistas y fitopatógenos

Para determinar el mecanismo del antagonismo ejercido por *Trichoderma* spp. sobre los patógenos, se observaron bajo microscopio de luz a 40 y 100X, las regiones de contacto entre los cinco aislados de *Trichoderma* (FAVF335, FAVF340, FAVF345, FAVF349, FAVF351) y cada uno de los hongos fitopatógenos evaluados. La observación de las interacciones de las hifas se realizó tomando una pequeña porción de hifas de la región de contacto entre el antagonista y el patógeno, y se colocó en un portaobjetos y se observó con un microscopio de luz.

2.4.8. Pruebas de antagonismo *in vivo*

De los cinco aislados de *Trichoderma* seleccionados *T. longibrachiatum* FAVF335), *T. longibrachiatum* (FAVF340), *T. afroharzianum* (FAVF345), *T. afroharzianum* (FAVF349) y *T. afroharzianum* (FAVF351), se utilizaron placas de (90 mm de diámetro) con colonias de cada aislado de ocho días de edad. Se agregaron 30 ml de agua destilada estéril, se extendió suavemente hasta que se liberaron las esporas, la suspensión se aforó a 100 ml en una probeta. El número de propágulos se cuantificaron usando una cámara de Neubauer y el inóculo se ajustó a 1×10^8 conidios mL^{-1} (Manganiello *et al*., 2018).

Se evaluaron cinco cepas de patógenos (*Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*). Una suspensión micelial por cada patógeno se preparó a partir de colonias de ocho días de crecimiento en PDA, las cuales se rasparon y licuaron con un volumen de 100 ml de agua destilada estéril, una vez licuado, se aforó hasta completar 2 L y se homogenizó. Con la suspensión de cada patógeno se infestó el sustrato (Peat Moss), previamente esterilizado mediante calor húmedo durante 5 h (Aloise *et al*., 2001; Velázquez-Martí *et al*., 2003; Chavez *et al*., 2009). El sustrato infestado por cada patógeno se transfirió a sus respectivas macetas (32 onzas) en el invernadero.

Las semillas de garbanzo de la variedad “Blanco Sinaloa 92” y variedad “P-22-45” se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1 % por 1 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente previamente esterilizado. Los tratamientos a las semillas fueron 48 con seis replicas biológicas por cada tratamiento, en los cuales se incluyeron cinco aislados de *Trichoderma*, *T. longibrachiatum* (FAVF335), *T. longibrachiatum* (FAVF340), *T. afroharzianum* (FAVF345), *T. afroharzianum* (FAVF349) y *T. afroharzianum* (FAVF351), un *Trichoderma* comercial (*T. harzianum*), un fungicida comercial (CRUISER MAXX Beans, Syngenta), cinco cepas de patógenos (*F. oxysporum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *S. rolfsii* y *S. sclerotiorum*), así como un testigo absoluto.

En el caso de las semillas tratadas con fungicida, estas se sumergieron un día antes de la siembra en la solución de fungicida por 60 min, cuya dosis fue 0.8 ml L^{-1}. Mientras que, el *Trichoderma* spp., se sumergió las semillas en suspensión de esporas (1 x 10^8 conidios mL^{-1}). Para cada uno de los aislados de *Trichoderma*, las semillas de garbanzo se recubrieron adecuadamente durante 60 min. Las semillas tratadas con diferentes agentes de control se sembraron en macetas de 32 onzas con sustrato infestado por los fitopatógenos. Se registró el porcentaje de germinación a los siete días después de la siembra (dds), mientras que la incidencia y severidad de la enfermedad se evaluó a los 25 dds. La evaluación de la enfermedad se basó en una escala de severidad de cuatro niveles o clases (Figura 3), donde 0= plantas asintomáticas; 1= plantas con 25% de amarillamiento y marchitamiento; 2= plantas con 50% de amarillamiento y

marchitamiento; 3= plantas con 75% amarillamiento y marchitamiento; 4= plantas con 100% de amarillamiento y marchitamiento (Bhattacharyya *et al*., 1985; Li *et al*., 2016; Paugh *et al*., 2019). Entretanto, la incidencia (%) de la enfermedad se determinó considerando la proporción de plantas enfermas por población. Otros parámetros como la altura de las plantas y la longitud de la raíz también fueron registrados.

Figura 2. Clases de severidad, **A).-** Clase 0= planta asintomática; **B).-** Clase 1= 25% de marchitamiento; **C).-** Clase 2= 50% de marchitamiento; **D).-** Clase 3= 75% de marchitamiento; **E).-** Clase 4= 100 % de marchitamiento.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 30 aislados de *Trichoderma* evaluados *in vitro*, solo cinco (FAVF335, FAVF340, *T*. FAVF345, FAVF349 y FAVF351) mantuvieron un porcentaje de inhibición mayor a 55 % sobre el crecimiento micelial de cada fitopatógeno. El aislado FAVF335, presentó la mayor inhibición de *Fusarium oxysporum* (64.7%) y *Macrophomina phaseolina* (67%), además, redujo un 63.9 y 57.4% del crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii,* respectivamente (Cuadro 2). Entretanto, el aislado FAVF340 causó una reducción de 71.3, 61.3, 64.4 y 60.2% del crecimiento de *S. sclerotiorum*, *S. rolfsii*, *M. phaseolina* y *F. oxysporum*, respectivamente. Cabe indicar que, los cinco aislados de *Trichoderma* mantuvieron un control similar (58.6–60.6%) sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Efectos antagonistas de aislados de *Trichoderma* en términos de % de inhibición contra hongos fitopatógenos causantes de la marchitez del garbanzo.

Aislados de *Trichoderma* spp.	% de inhibición del crecimiento micelial para cada patógeno					
	Fusarium oxysporum	*Macrophomina phaseolina*	*Rhizoctonia solani*	*Sclerotinia sclerotiorum*	*Sclerotium rolfsii*	Combinado
FAVF340	60.2 ab	64.4 a	58.9 a–d	71.3 a	61.3 a	63.2 a
FAVF335	64.7 a	67.0 a	59.4 a–c	63.9 ab	57.4 ab	62.5 a
FAVF351	59.0 ab	62.8 a	60.6 a	60.9 ab	56.4 a–d	59.9 a
FAVF345	57.7 b	62.0 a	59.8 ab	62.4 ab	57.3 ab	59.8 a
FAVF349	57.4 b	61.9 a	58.6 a–e	62.2 ab	57.0 a–c	59.4 a
FAVF350	50.7 c	50.6 b–d	49.9 d–h	58.3 b	54.2 a–e	52.8 b
FAVF348	48.4 cd	50.3 b–e	48.1 f–h	59.0 b	50.5 b–e	51.3 bc
FAVF334	46.5 cd	46.3 b–f	54.0 a–g	59.3 b	48.5 b–f	50.9 bc
FAVF333	47.4 cd	46.3 b–f	47.5 f–h	59.3 b	51.3 b–e	50.4 b–d
FAVF347	46.4 cd	51.2 bc	52.4 a–h	56.6 bc	45.1 ef	50.4 b–d
FAVF329	47.9 cd	46.9 b–f	50.5 c–h	56.6 bc	49.0 b–e	50.2 b–d
FAVF352	46.1 cd	49.2 b–f	47.1 f–h	54.9 b–d	53.2 a–e	50.1 b–d
FAVF341	46.3 cd	42.9 fg	48.8 f–h	61.1 ab	50.7 b–e	49.9 b–e
FAVF353	47.9 cd	47.2 b–f	51.5 b–h	53.3 b–d	49.6 b–e	49.9 b–e
FAVF332	45.6 cd	52.6 b	48.0 f–h	55.8 b–d	47.0 d–f	49.8 b–e

FAVF346	46.2 cd	49.1 b–f	49.6 e–h	55.2 b–d	48.8 b–f	49.8 b–e
FAVF343	46.4 cd	43.5 d–g	50.8 c–h	60.0 ab	47.6 c–f	49.6 b–e
FAVF336	47.7 cd	46.3 b–f	48.5 f–h	58.0 b	47.2 d–f	49.5 b–e
FAVF342	46.0 cd	45.9 b–f	49.9 d–h	60.1 ab	45.2 ef	49.4 b–e
FAVF330	46.0 cd	46.9 b–f	48.6 f–h	58.4 b	46.5 ef	49.3 b–e
FAVF325	46.7 cd	48.4 b–f	48.3 f–h	52.3 b–d	50.5 b–e	49.2 b–e
FAVF327	47.1 cd	47.8 b–f	46.6 gh	56.2 bc	46.2 ef	48.8 b–e
FAVF339	47.2 cd	42.0 fg	50.1 d–h	56.7 bc	47.6 c–f	48.7 b–e
FAVF324	49.3 c	45.7 b–f	55.8 a–f	46.1 cd	46.0 ef	48.6 b–e
FAVF328	45.7 cd	44.6 c–f	46.1 gh	57.0 bc	46.0 ef	47.9 b–e
FAVF338	45.5 cd	45.1 c–f	44.12 h	54.9 b–d	48.6 b–f	47.6 c–e
FAVF331	46.0 cd	43.2 e–g	46.6 gh	54.0 b–d	46.6 ef	47.3 c–e
FAVF326	46.0 cd	44.0 c–g	44.8 h	52.8 b–d	45.7 ef	46.6 c–e
FAVF337	42.85 d	36.7 g	48.9 f–h	53.8 b–d	45.1 ef	45.5 de
FAVF344	47.8 cd	44.0 c–g	49.4 f–h	44.1 d	39.5 f	44.9 e

***Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de (Tukey α=0.05).**

Los resultados obtenidos de los cinco aislados que mantuvieron los más altos porcentajes de inhibición son semejantes a los reportados por Oliva *et al*. (2016) en el cual se utilizaron cepas nativas de *Trichoderma* spp., bacterias del género *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. para el control de varios patógenos con origen en el suelo, incluyendo a *Fusarium*. También concuerdan con lo indicado por Ríos *et al*. (2016), quienes evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* contra *Fusarium oxysporum* y reportaron un porcentaje de inhibición por encima de 50%.

Respecto a *F. oxysporum*, el *Trichoderma* que exhibió la mejor inhibición *in vitro* fue el aislado FAVF335. En el caso de *M*. *phaseolina* no existió diferencia significativa entre los mejores cinco aislados de *Trichoderma.* Para el patógeno *R*. *solani*, los porcentajes de inhibición entre los mejores cinco aislados fueron similares. Mientras que, el aislado FAVF340 mantuvo el mayor porcentaje de inhibición sobre los patógenos *S*. *sclerotiorum* y *S*. *rolfsii* (Cuadro 2). La actividad antagónica máxima sobre el complejo de hongos fue mostrada por los aislados FAVF340 y FAVF335, además, se observó que en la

confrontación de estos dos aislados de *Trichoderma* contra los fitopatógenos, provocaron cambio de color en el medio de cultivo y exhibieron una zona de inhibición de crecimiento en algunos patógenos a partir de las 48 h, e impidiendo el contacto de micelio del antagonista con el micelio del patógeno, lo que podría deberse a la excreción de metabolitos secundarios como se muestra en la Figura 4B y Figura 5J.

El análisis filogenético (Figura 4) generado con la combinación de datos de secuencias ITS, EF-1α y RPB2 e inferido bajo el criterio de Máxima Verosimilitud, mostró la suficiente información para distinguir a los aislados FAVF345, FAVF349 y FAVF351 en el clado de *Trichoderma afroharzianum.* Mientras que, los aislados FAVF335 y FAVF340 se ubicaron con buen soporte en el clado de *Trichoderma longibrachiatum*.

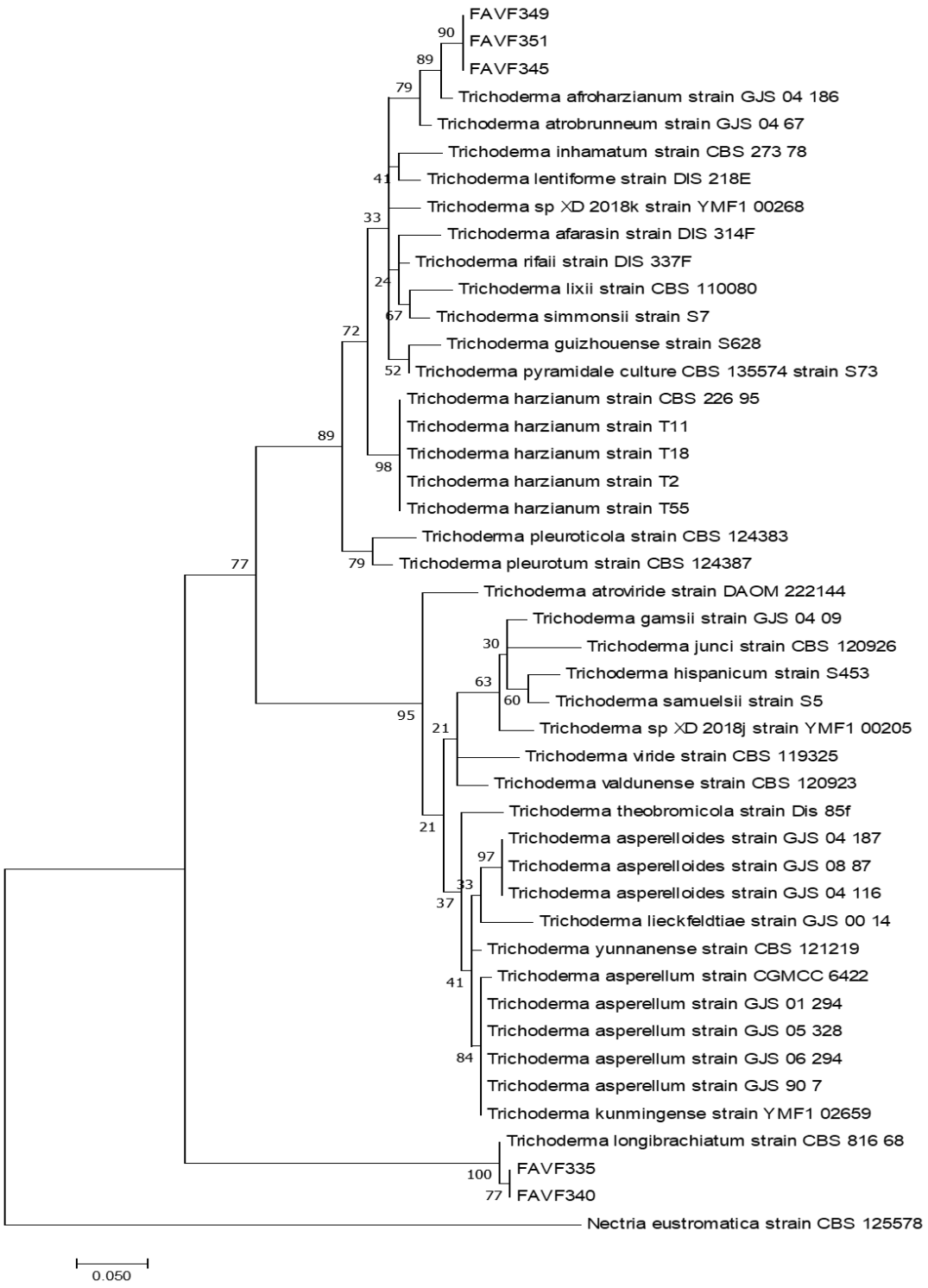


Figura 3. Arbol filogenetico generado con analisis de secuencias ITS, EF-1α y RPB2 de especies de Trichoderma.

Los valores de soporte Bootstrap para máxima verosimilitud están indicados en los nodos. *Nectria eustromatica* CBS 125578 se usó como grupo externo. La barra de escala indica el número de cambio esperados por sitio.

Los resultados de nuestro estudio fueron similares a los de otros autores en los cuales reportaron la capacidad antagónica en condiciones *in vitro* de aislados de *T. longibrachiatum* contra *Fusarium verticillioides* y *F. oxysporum* (Sobowale *et al*., 2010; Hewedy *et al*., 2019). También coinciden con los resultados de Sallam *et al*. (2019), quienes probaron siete aislados de *Trichoderma* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, de los cuales un aislado de *T. longibrachiatum* tuvo un crecimiento superior y exhibió un antagonismo significativo contra el patógeno causante de la marchitez del tomate. Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con Tchameni *et al*. (2019) quienes reportaron que una cepa de *T. afroharzianum* inhibió de manera significativa a *Pythium myriotylum* en condiciones *in vitro*.

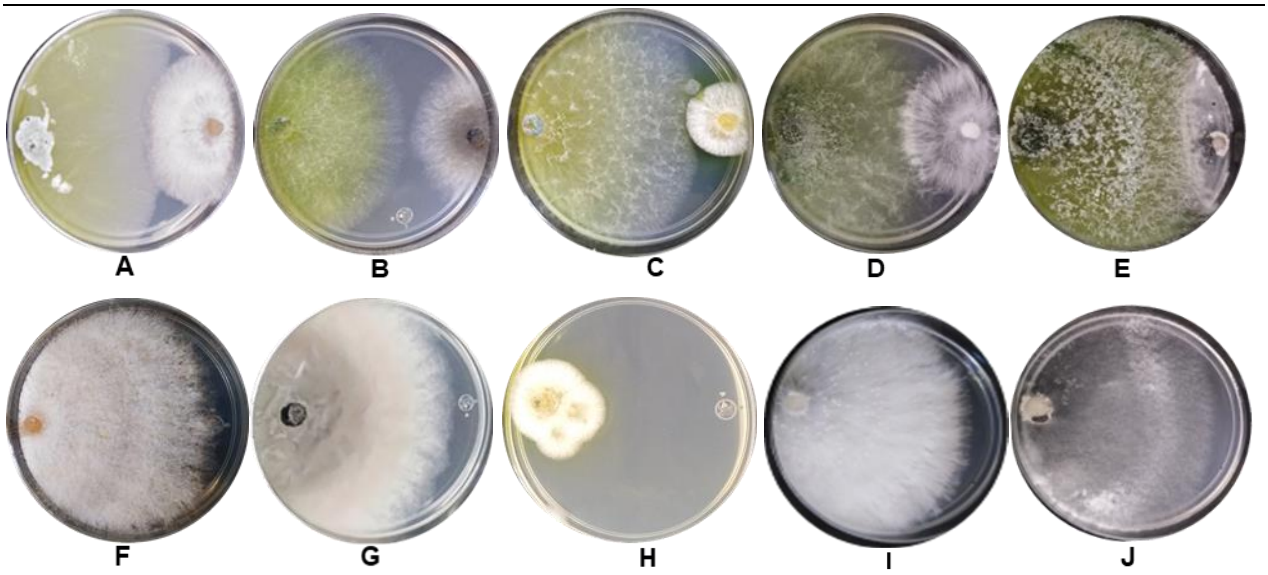


Figura 4.- A) Antagonismo de T. longibrachiatum (FAVF335) contra *Fusarium oxysporum*; **B)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *Macrophomina phaseolina*; **C)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *Rhizoctonia solani*; **D)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *Sclerotium rolfsii* y **E)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *Sclerotinia sclerotiorum* a los tres días posteriores a la confrontación. **F**= Testigo

de *Fusarium oxysporum*; **G**= Testigo de *Macrophomina phaseolina*; **H**= Testigo de *Rhizoctonia solani*; **I**= Testigo de *Sclerotium rolfsii* y **J**= Testigo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

En los contactos que se dieron entre el micelio de los antagonistas y él de los fitopatógenos, los aislados *T. longibrachiatum* (FAVF335), *T. longibrachiatum* (FAVF340), *T*. *afroharzianum* (FAVF345), *T*. *afroharzianum* (FAVF349) y *T*. *afroharzianum* (FAVF351) desarrollaron una barrera para evitar el paso del patógeno, además que lo invadieron. En ciertas confrontaciones, el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF335) mostró una actividad antibiótica contra *M*. *phaseolina* (Figura 7B), mientras que el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) desarrolló la actividad antibiótica contra *S*. *rolfsii* (Figura 7J). La actividad antibiótica de ciertos aislados de *Trichoderma* es el resultado de la producción de compuestos volátiles con los que desactivan a los patógenos y les hacen más susceptibles a los metabolitos no volátiles provocando inhibición del crecimiento o muerte celular, sin embargo, la contribución relativa de las enzimas líticas y los antibióticos de *Trichoderma* spp. contra los fitopatógenos se ha estudiado poco (Vey *et al*., 2001; Harman *et al*., 2004b; Omann et al., 2012).

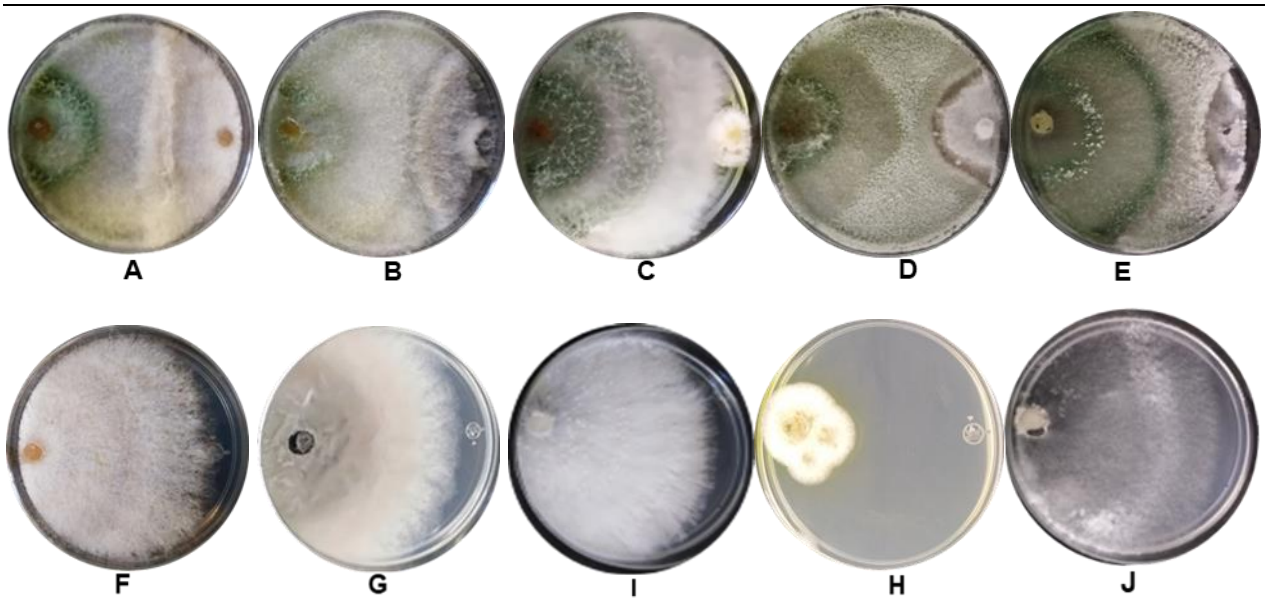


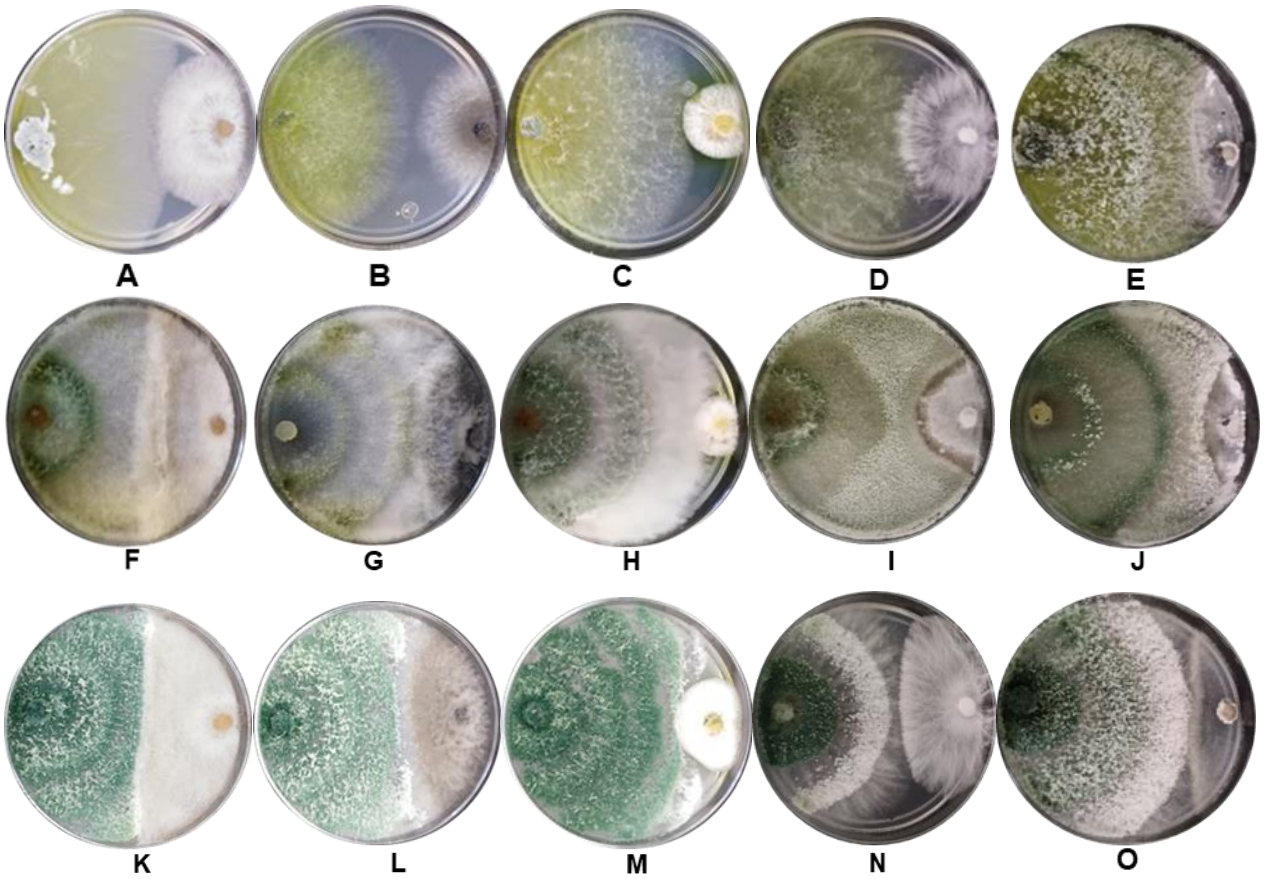
Figura 5.- A) Antagonismo de T. longibrachiatum (FAVF340) contra *Fusarium oxysporum*; **B)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *Macrophomina phaseolina*; **C)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF340)

contra *Rhizoctonia solani*; **D)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *Sclerotium rolfsii* y **E)** Antagonismo de *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *Sclerotinia sclerotiorum* a los tres días posteriores a la confrontación. **F**= Testigo de *Fusarium oxysporum*; **G**= Testigo de *Macrophomina phaseolina*; **H**= Testigo de *Rhizoctonia solani*; **I**= Testigo de *Sclerotium rolfsii*; **J**= Testigo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

El comportamiento de los 30 aislados de *Trichoderma* frente a los cinco patógenos mostró que la actividad antagónica máxima (71.3%) fue obtenida con el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) sobre el patógeno *S. sclerotiorum*. La mayoría de los aislados de *Trichoderma* mostraron una mejor capacidad para parasitar a *S. sclerotiorum* y *R. solani* que los demás patógenos del complejo (Cuadro 2). Los resultados de este trabajo coinciden con la investigación previa de Mishra *et al*. (2000) quienes encontraron que *R. solani* fue más susceptible a la inhibición por los aislados de *Trichoderma* en comparación con *S. rolfsii* y *F. oxysporum*.

En cuanto a las observaciones de las interacciones vistas en microscopía de luz, a los cinco días después de las confrontaciones duales, los aislados de *Trichoderma* invadieron a las colonias de los patógenos. El antagonismo se observó principalmente por el mecanismo de micoparasitismo y de competencia (Figura 7). Las hifas del aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) se adhirieron a las hifas de *M. phaseolina* a través del enrollamiento que finalmente formaron haustorios y penetraron a la pared del patógeno (Figura 7A). La penetración de la pared celular es por la secreción de enzimas degradadoras (Howell, 2003; El-Debaiky *et al*., 2017). El mismo aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) usó el mecanismo de antibiosis sobre *S. sclerotiorum* y *M. phaseolina* (Figura 6, G e I). Mientras que, el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF335) parasitó a *F. oxysporum* mediante el mecanismo de micoparasitismo y antibiosis, formando gran cantidad de haustorios en hifas de *F. oxysporum* (Figura 7C), sin embargo, controló a *M. phaseolina* principalmente por antibiosis (Figura 6B). El antagonista *T. afroharzianum* (FAVF351) penetró directamente las hifas de *R. solani* y creció dentro de estas (Figura 7B). Entretanto, el antagonista *T. afroharzianum* (FAVF345) mostró el crecimiento de sus hifas alrededor del patógeno *S. rolfsii*, tras el reconocimiento del patógeno se unió a las hifas y las penetró (Figura 7D). En caso del aislado *T.*

afroharzianum (FAVF349), produjo estructuras similares a ganchos y apresorios que le facilitaron la penetración de las hifas de *S. sclerotiorum* (Figura 7E). Los aislados *T. longibrachiatum* (FAVF335) y *T. longibrachiatum* (FAVF340) fueron los más efectivos para inhibir el crecimiento de los patógenos evaluados como se mostró anteriormente en los cultivos duales (Figura 6).



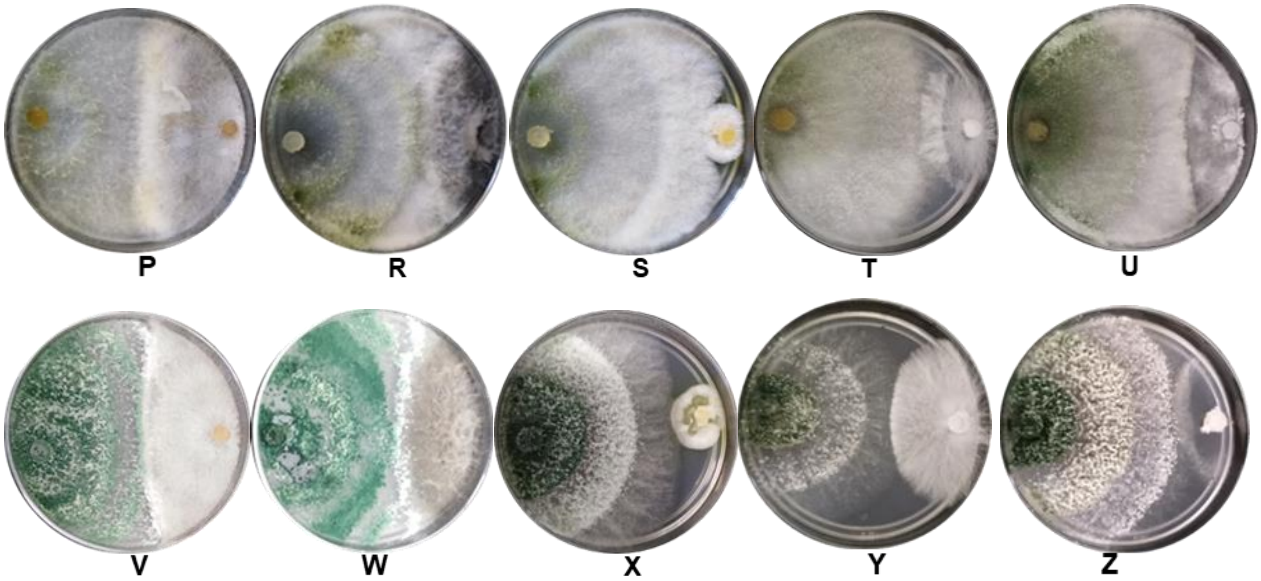


Figura 6.- A) T. longibrachiatum (FAVF335) contra F. oxysporum; B) *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *M. phaseolina*; **C)** *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *R. solani*; **D)** *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *S. rolfsii*; **E)** *T. longibrachiatum* (FAVF335) contra *S. sclerotiorum*; **F)** *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *F. oxysporum*; **G)** *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *M. phaseolina*; **H)** *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *R. solani*; **I)** *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *S. rolfsii*; **J)** *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra *S. sclerotiorum*; **K)** *T. afroharzianum* (FAVF345) contra *F. oxysporum*; **L)** *T. afroharzianum* (FAVF345) contra *M. phaseolina*; **M)** *T. afroharzianum* (FAVF345) contra *R. solani*; **N)** *T. afroharzianum* (FAVF345) contra *S. rolfsii*; **O)** *T. afroharzianum* (FAVF345) contra *S. sclerotiorum*; **P)** *T. afroharzianum* (FAVF349) contra *F. oxysporum*; **R)** *T. afroharzianum* FAVF349 contra *M. phaseolina*; **S)** *T. afroharzianum* (FAVF349) contra *R. solani*; **T)** *T. afroharzianum* (FAVF349) contra *S. rolfsii*; **U)** *T. afroharzianum* (FAVF349) contra *S. sclerotiorum*; **V)** *T. afroharzianum* (FAVF351) contra *F. oxysporum*; **W)** *Trichoderma* FAVF351 contra *M. phaseolina*; **X)** *Trichoderma* FAVF351 contra *R. solani*; **Y)** *Trichoderma* FAVF351 contra *S. rolfsii*; **Z)** *Trichoderma* FAVF351 contra *S. sclerotiorum* a los tres días posteriores a la confrontacin (dpc) en medio PDA.

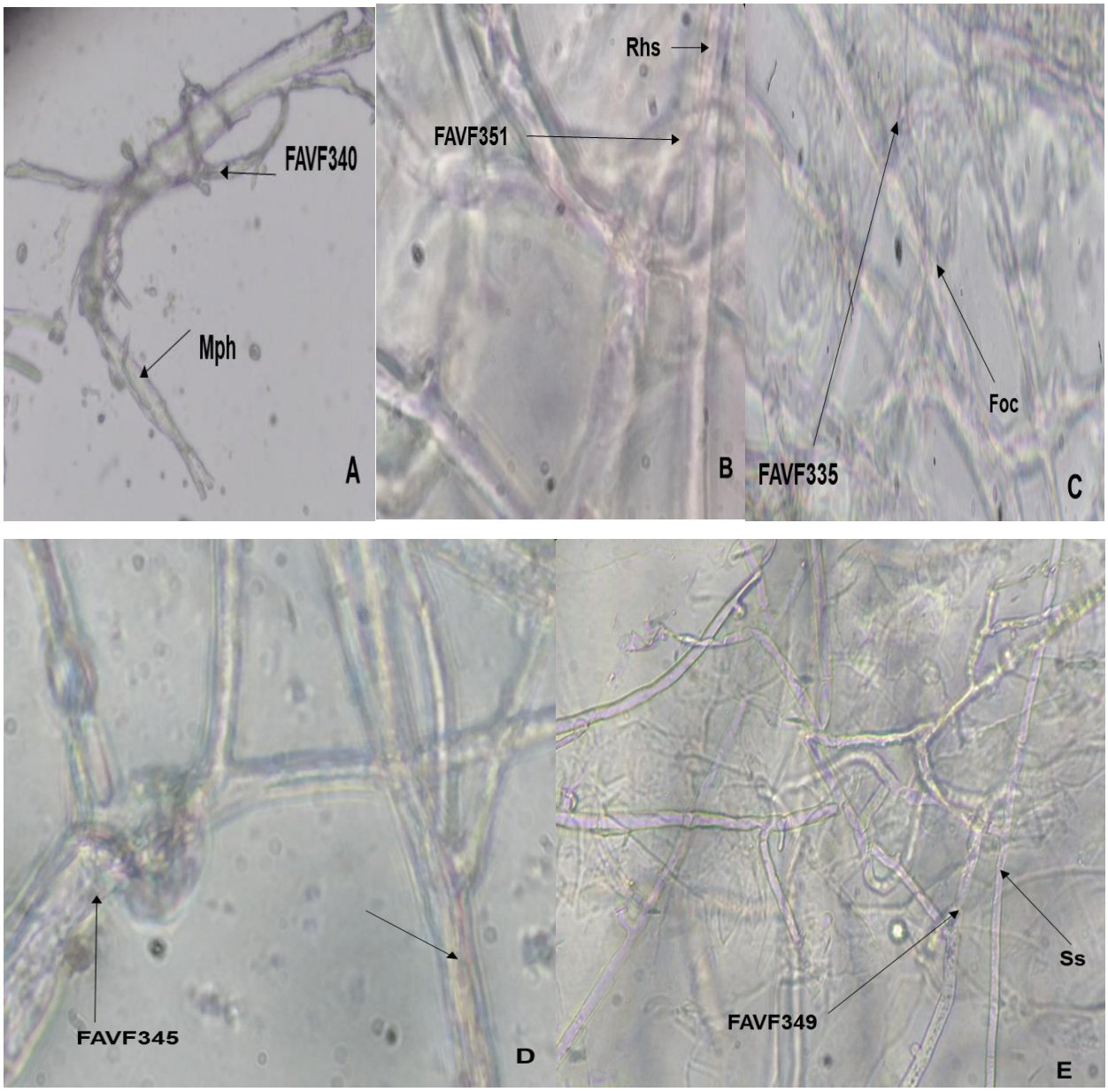


Figura.-7. Micoparasitismo de Trichoderma spp. en pruebas in vitro. A) *T*. *longibrachiatum* (FAVF340) vs Mph (100X); **B)** ***T. afroharzianum*** (FAVF351) vs Rhs (100X); **C)** *T*. *longibrachiatum* (FVAF335) vs Fo (400X); **D)** ***T*. *afroharzianum*** (FAVF345) vs Sr (100X) y **E)** ***T*. *afroharzianum*** (FAVF349) vs Ss (40X). **Mph=** *M*. *phaseolina**;*** **Rhs=** *R*. *solani***; Fo=** *F*. *oxysporum*; **Sr=** *S*. *rolfsii*; **Ss**= *S*. *sclerotiorum*.

Los resultados de este trabajo concuerdan con Gveroska y Ziberoski (2012), quienes registraron deformaciones en las hifas de *A*. *alternata* como resultado de la acción de *T*. *harzianum*. Por otro lado, Abdullah *et al*. (2008) informaron también que las hifas de la

cepa *T. harzianum* en contacto con las hifas de *S. sclerotiorum* produjeron estructuras similares a ganchos y apresorios, que permitieron la penetración de las hifas de *S. sclerotiorum*. Según investigaciones previas, las lectinas están involucradas de manera directa en el proceso de micoparatismo de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos y revelaron que existe una correlación positiva entre la cantidad de enzimas y el porcentaje de inhibición del antagonista (Michel-Aceves *et al*., 2005; Infante *et al*., 2009).

Respecto al análisis morfológico, las colonias de los aislados conservaron las características del género *Trichoderma*, pero, presentaron variaciones en el color de las esporas y el patrón de esporulación en cultivo PDA. En su inicio, las colonias aparecieron con color blanco, luego se cambiaron a color verde claro o verde intenso, también se tornaron a amarillento claro o intenso con esporulación densa con tiempo de incubación (Cuadro 3) y (Figura 2), y se desarrollan conidióforos ramificados en forma de un árbol, presenta la formación de esporas asexuales o conidios sobre fiálides (Figura 5). Los conidióforos mantienen la población del hongo durante el proceso vegetativo de las plantas (Rifai, 1969; Hermosa *et al*., 2011; Qiao *et al*., 2018).

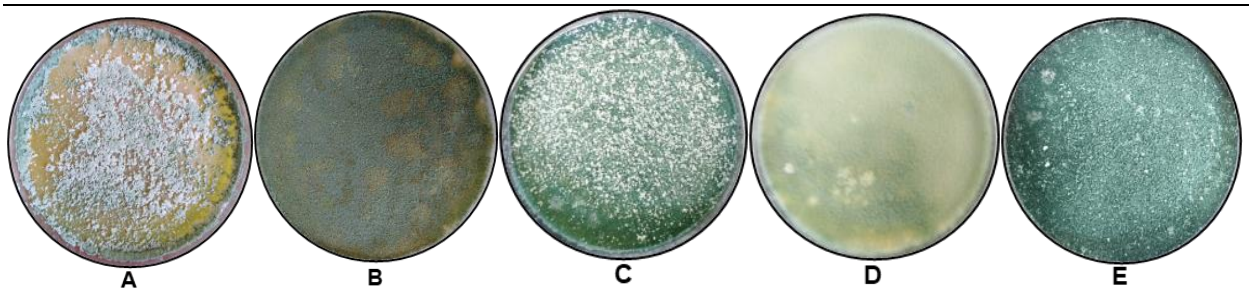


Figura 8.- Colonias de los cinco aislados de Trichoderma con mayor porcentaje de inhibición. A) *T. longibrachiatum* (FAVF335); **B)** *T. longibrachiatum* (FAVF340); **C)** *T. afroharzianum* (FAVF345); **D)** *T. afroharzianum* (FAVF349); **E)** *T. afroharzianum* (FAVF351).

Cuadro 3.- Variaciones en la colonia de los aislados de *Trichoderma* spp.

Aislados de *Trichoderma* spp.	Descripción
T. longibrachiatum (FAVF335)	Coloración amarilla con esporulación densa (Figura 2A)
T. longibrachiatum (FAVF340)	Coloración verde claro en su colonia con esporulación densa (Figura 2B)
T. afroharzianum (FAVF345)	Colonia con coloración verde oscuro con esporulación densa (Figura 2C)
T. afroharzianum (FAVF349)	Colonia amarilla claro con esporulación densa (Figura 2D)
T. afroharzianum (FAVF351)	Colonia verde oscuro con esporulación densa (Figura 2E)

2.5.1. Antagonismo de *Trichoderma* spp. en invernadero.

En la prueba de biocontrol *in vivo*, todos los fitopatógenos pertenecientes al complejo de hongos con origen en el suelo causantes de la marchitez del garbanzo ocasionaron 100% de incidencia de la enfermedad en las plantas de garbanzo y se registró un porcentaje por encima de 84% de severidad para la variedad Blanco Sinaloa-92 y más de 86% para la variedad P-22-45. *Fusarium oxysporum* registró los mayores porcentajes de severidad (96.6 y 98.3%) para la variedad Blanco Sinaloa-92 y variedad P-22-45, respectivamente. Mientras que, *R. solani* mostró los menores porcentajes de severidad, 85% para Blanco Sinalo-92 y 86.6 % para la variedad P-22-45 (Cuadros 4 y 5). Cuando las semillas de la variedad Blanco Sinaloa-92 fueron tratadas con los *Trichoderma* spp. y el fungicida comercial hubo una reducción de la enfermedad de 33.3 a 100% y de 75 a 100% para las variables incidencia y severidad, respectivamente. En el caso de la variedad P-22-45, la reducción fue de 50 a 100% y de 86.6 a 100% para la incidencia y la severidad, respectivamente.

Cabe resaltar que en la prueba *in vivo*, el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) mostró una reducción de 100% de incidencia y severidad en la variedad Blanco Sinaloa-92 contra

el complejo de hongos, mientras que para la variedad P-22-45, el mismo aislado mostró los mayores porcentajes de reducción que oscilaron entre 66.7 a 100% para la incidencia y de 96.6 a 100% para la severidad. Claramente se observó, que la aplicación de los antagonistas protegió a las plantas de garbanzo del ataque de los fitopatógenos y mejoró el desarrollo de las plantas (Cuadros 4 y 5).

En este estudio, los aislados *T. longibrachiatum* (FAVF340) y *T. longibrachiatum* (FAVF335) mostraron el mejor control *in vivo* sobre el complejo de hongos fitopatógenos. Asimismo, el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) presentó el mayor control contra los patógenos, comparados incluso con el *Trichoderma* comercial y al fungicida comercial, los cuales redujeron incidencia y severidad. Del mismo modo el aislado *T. longibrachiatum* (FAVF340) estimuló el mayor desarrollo de las plantas (19.3 a 25 cm) en altura y en longitud de raíz (13. a 14.6 cm) para la variedad Blanco Sianloa-92 en comparación con los demás tratamientos, sin embargo, para la variedad P-22-45, la altura de las plantas varió de 14.6 a 19. cm y la longitud de la raíz fue de 11.6 a 14. cm (Cuadros 4 y 5). Las plantas de semillas no tratadas (testigo absoluto) mostraron porcentajes de 33.3 y 50% de incidencia para la variedad Blanco Sinaloa-92 y variedad P-22-45, respectivamente. Entretanto, las plantas de semillas tratadas solo con *Trichoderma* spp. o fungicida mostraron porcentajes de incidencia y de severidad nulos en las dos variedades. Al observar los resultados de las confrontaciones antagonistas-patógenos con las semillas y las semillas solas inoculadas con patógenos, mostraron que la variedad P-22-45 es más susceptible a los patógenos con origen en el suelo en comparación con la variedad Blanco Sinaloa-92 (Cuadros 4 y 5).

Cuadro 4.- Efectos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y la supresión de la marchitez del garbanzo en variedad Blanco Sinaloa-92.

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)	Altura de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)
Fusarium oxysporum	100 a	96.67 a	10.00 o–q	5.33 o
Macrophomina phaseolina	100 a	91.67 ab	8.17 q	8.17 l–n
Rhizoctonia solani	100 a	85.00 b	12.00 m–q	6.50 no
Sclerotium rolfsii	100 a	91.67 ab	10.51 n–q	7.00 m–o

Sclerotinia sclerotiorum	100 a	93.33 ab	9.48 pq	7.00 m–o
T. longibrachiatum (FAVF335) + *F. oxysporum*	16.7 cd	1.67 fg	15.67 f–m	12.00 c–h
T. longibrachiatum (FAVF335) + *M. phaseolina*	0.00 d	0.00 g	15.67 f–m	12.33 b–g
T. longibrachiatum (FAVF335) + *R. solani*	16.7 cd	1.67 fg	20.83 bc	13.33 b–e
T. longibrachiatum (FAVF335) + *S. rolfsii*	0.00 d	0.00 g	17.67 c–k	13.33 b–e
T. longibrachiatum (FAVF335) + *S. sclerotiorum*	0.00 d	0.00 g	18.00 c–j	12.33 b–g
T. longibrachiatum (FAVF340) + *F. oxysporum*	0.00 d	0.00 g	25.00 a	13.33 b–e
T. longibrachiatum (FAVF340) + *M. phaseolina*	0.00 d	0.00 g	20.33 b–e	13.33 b–e
T. longibrachiatum (FAVF340) + *R. solani*	0.00 d	0.00 g	19.33 c–g	14.67 b
T. longibrachiatum (FAVF340) + *S. rolfsii*	0.00 d	0.00 g	20.33 b–e	13.00 b–e
T. longibrachiatum (FAVF340) + *S. sclerotiorum*	0.00 d	0.00 g	19.67 c–f	13.33 b–e
T. afroharzianum (FAVF345) + *F. oxysporum*	50.00 bc	6.67 c–g	15.67 f–m	10.00 g–l
T. afroharzianum (FAVF345) + *M. phaseolina*	50.00 bc	5.00 d–g	14.00 j–o	10.00 g–l
T. afroharzianum (FAVF345) + *R. solani*	16.7 cd	1.67 fg	13.83 k–o	9.00 j–m
T. afroharzianum (FAVF345) + *S. rolfsii*	50.00 bc	13.33 cd	14.67 i–m	9.67 h–l
T. afroharzianum (FAVF345) + *S. sclerotiorum*	50.00 bc	15.00 c	15.33 g–m	9.67 h–l
T. afroharzianum (FAVF349) + *F. oxysporum*	66.7 ab	11.67 c–e	17.67 c–k	9.67 h–l
T. afroharzianum (FAVF349) + *M. phaseolina*	50.00 bc	13.33 cd	13.33 l–p	9.33 i–m
T. afroharzianum (FAVF349) + *R. solani*	50.00 bc	10.00 c–f	15.33 g–m	9.00 j–m
T. afroharzianum (FAVF349) + *S. rolfsii*	50.00 bc	8.33 c–g	13.33 l–p	10.33 f–l
T. afroharzianum (FAVF349) + *S. sclerotiorum*	50.00 bc	8.33 c–g	14.33 i–n	10.00 g–l
T. afroharzianum (FAVF351) + *F. oxysporum*	66.7 ab	8.33 c–g	18.33 3 c–i	9.33 i–m
T. afroharzianum (FAVF351) + *M. phaseolina*	33.3 b–d	6.67 c–g	14.50 i–n	9.00 j–m
T. afroharzianum (FAVF351) + *R. solani*	50.00 bc	11.67 c–e	12.83 l–p	8.67 k–n
T. afroharzianum (FAVF351) + *S. rolfsii*	16.7 cd	1.67 fg	14.67 i–m	9.33 i–m
T. afroharzianum (FAVF351) + *S. sclerotiorum*	50.00 bc	6.67 c–g	14.67 i–m	9.00 j–m
Trichoderma comercial + *F. oxysporum*	33.3 b–d	3.33 e–g	16.67 d–l	13.67 b–d
Trichoderma comercial + *M. phaseolina*	16.7 cd	1.67 fg	16.33 e–l	13.00 b–e
Trichoderma comercial + *R. solani*	0.00 d	0.00 g	14.33 i–n	12.33 b–g
Trichoderma comercial + *S. rolfsii*	50.00 bc	8.33 c–g	15.33 g–m	11.67 d–i
Trichoderma comercial + *S. sclerotiorum*	33.3 b–d	3.33 e–g	15.67 f–m	12.00 c–h
Fungicida comercial + *F. oxysporum*	16.7 cd	1.67 fg	15.33 g–m	11.33 d–j
Fungicida comercial + *M. phaseolina*	33.3 b–d	3.33 c–g	14.33 i–n	11.00 e–k
Fungicida comercial + *R. solani*	0.00 d	0.00 g	20.33 b–e	11.00 e–k
Fungicida comercial + *S. rolfsii*	50.00 bc	5.00 d–g	17.67 c–k	10.00 g–l
Fungicida comercial + *S. sclerotiorum*	16.7 cd	1.67 fg	12.67 l–p	10.00 g–l
T. longibrachiatum (FAVF335)	0.00 d	0.00 g	24. 00 ab	14.33 bc

T. longibrachiatum (FAVF340)	0.00 d	0.00 g	27.33 a	18.33 a
T. afroharzianum (FAVF345)	0.00 d	0.00 g	13.00 l–p	12.67 b–f
T. afroharzianum (FAVF349)	0.00 d	0.00 g	15.00 h–m	11.33 d–j
T. afroharzianum (FAVF351)	0.00 d	0.00 g	20.67 b–d	11.33 d–j
Trichoderma comercial	0.00 d	0.00 g	19.00 c–h	17.67 a
Fungicida comercial	0.00 d	0.00 g	18.00 c–j	12.67 b–f
Control absoluto	33.3 b–d	8.33 c–g	14.00 j–o	11.00 e–k

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de LSD de Fisher (α=0.05).

Cuadro 5.- Efectos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y la supresión de la marchitez del garbanzo en variedad P-22-45.

Tratamiento	Incidencia (%)	Severidad (%)	Altura de planta (cm)	Longitud de raíz (cm)
Fusarium oxysporum	100 a	98.33 a	9.33 q–t	5.50 q–s
Macrophomina phaseolina	100 a	93.33 ab	6.53 t	4.41 s
Rhizoctonia solani	100 a	86.67 b	7.21 t	5.21 q–s
Sclerotium rolfsii	100 a	90.00 ab	7.88 st	6.50 p–r
Sclerotinia sclerotiorum	100 a	93.33 ab	8.69 r–t	4. 79 rs
T. longibrachiatum (FAVF335) + *F. oxysporum*	33.3 bc	3.33 c–e	15.00 e–k	11.00 c–g
T. longibrachiatum (FAVF335) + *M. phaseolina*	0.00 c	0.00 e	14. 33 f–l	12.50 a–c
T. longibrachiatum (FAVF335) + *R. solani*	16.7 bc	1.67 de	13.00 i–p	10.33 e–j
T. longibrachiatum (FAVF335) + *S. rolfsii*	33.3 bc	5.00 c–e	15.67 d–i	12.33 a–d
T. longibrachiatum (FAVF335) + *S. sclerotiorum*	50.00 b	6.67 c–e	13.67 g–m	12.67 a–c
T. longibrachiatum (FAVF340) + *F. oxysporum*	0.00 c	0.00 e	19.00 ab	14.00 a
T. longibrachiatum (FAVF340) + *M. phaseolina*	0.00 c	0.00 e	15.33 d–j	12.67 a–c
T. longibrachiatum (FAVF340) + *R. solani*	16.7 bc	3.33 c–e	18.00 a–d	11.67 b–f
T. longibrachiatum (FAVF340) + *S. rolfsii*	33.3 bc	3.33 c–e	15.00 e–k	11.67 b–f
T. longibrachiatum (FAVF340) + *S. sclerotiorum*	0.00 c	0.00 e	14.67 e–l	13.00 ab
T. afroharzianum (FAVF345) + *F. oxysporum*	50.00 b	6.67 c–e	11.33 m–r	8.33 i–n
T. afroharzianum (FAVF345) + *M. phaseolina*	50.00 b	11.67 cd	12.00 l–q	9.00 h–n
T. afroharzianum (FAVF345) + *R. solani*	50.00 b	11.67 cd	14.33 f–l	9.00 h–n
T. afroharzianum (FAVF345) + *S. rolfsii*	33.3 bc	5.00 c–e	14.00 f–m	9.00 h–n
T. afroharzianum (FAVF345) + *S. sclerotiorum*	50.00 b	8.33 c–e	14.00 f–m	8.00 l–p
T. afroharzianum (FAVF349) + *F. oxysporum*	50.00 b	8.33 c–e	10.67 o–s	8.67 j–o
T. afroharzianum (FAVF349) + *M. phaseolina*	50.00 b	6.67 c–e	11.00 n–r	10.00 f–k

T. afroharzianum (FAVF349) + *R. solani*	33.3 bc	8.33 c–e	13.33 h–o	8.00 l–p
T. afroharzianum (FAVF349) + *S. rolfsii*	50.00 b	10.00 c–e	12.33 k–p	7.33 n–p
T. afroharzianum (FAVF349) + *S. sclerotiorum*	33.3 bc	5.00 c–e	13. 33 h–o	7.67 m–p
T. afroharzianum (FAVF351) + *F. oxysporum*	33.3 bc	8.33 c–e	13.67 g–n	8.67 j–o
T. afroharzianum (FAVF351) + *M. phaseolina*	16.7 bc	13.33 c	16.33 b–g	8.83 i–n
T. afroharzianum (FAVF351) + *R. solani*	33.3 bc	6.67 c–e	12.67 j–p	10.33 e–j
T. afroharzianum (FAVF351) + *S. rolfsii*	50.00 bc	10.00 c–e	13.33 h–o	8.67 j–o
T. afroharzianum (FAVF351) + *S. sclerotiorum*	50.00 b	13.33 c	14.67 e–l	7.00 o–q
Trichoderma comercial + *F. oxysporum*	33.3 bc	3.33 c–e	13.67 g–n	9.50 g–l
Trichoderma comercial + *M. phaseolina*	50.00 b	10.00 c–e	19.33 a	10.00 f–k
Trichoderma comercial + *R. solani*	50.0 b	8.33 c–e	13.67 g–n	8.67 j–o
Trichoderma comercial + *S. rolfsii*	50.00 b	8.33 c–e	13.00 i–p	9.33 g–m
Trichoderma comercial + *S. sclerotiorum*	33.3 bc	5.00 c–e	15.67 d–i	10.33 e–j
Fungicida comercial + *F. oxysporum*	33.3 bc	5.00 c–e	12.67 j–p	9.00 h–n
Fungicida comercial + *M. phaseolina*	16.7 bc	1.67 de	16.00 c–h	10.50 e–i
Fungicida comercial + *R. solani*	50.00 b	5.00 c–e	12.33 k–p	10.67 d–h
Fungicida comercial + *S. rolfsii*	33.3 bc	5.00 c–e	14.00 f–m	7.67 m–p
Fungicida comercial + *S. sclerotiorum*	50.00 b	6.67 c–e	14.00 f–m	12.00 b–e
T. longibrachiatum (FAVF335)	0.00 c	0.00 e	16.67 a–f	14.00 a
T. longibrachiatum (FAVF340)	0.00 c	0.00 e	19.00 ab	14.00 a
T. afroharzianum (FAVF345)	0.00 c	0.00 e	10.67 o–s	11.67 b–f
T. afroharzianum (FAVF349)	0.00 c	0.00 e	10.33 o–s	10.33 e–j
T. afroharzianum (FAVF351)	0.00 c	0.00 e	12.00 l–q	11.67 b–f
Trichoderma comercial	0.00 c	0.00 e	18.67 a–c	12.50 a–c
Fungicida comercial	0.00 c	0.00 e	17.33 a–e	10.33 a–d
Control absoluto	50.00 b	6.67 c–e	13.67 g–n	10.16 f–j

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de LSD de Fisher (α=0.05).

Los efectos benéficos por *Trichoderma* spp. en las plantas se caracterizan en gran medida por una notable promoción del crecimiento tanto en la parte aérea como en las raíces de las plantas y se aumenta considerablemente la defensa de las plantas al ataque de los hongos fitopatógenos (Lorito *et al*., 2010). *Trichoderma* spp. exhiben diferentes patrones de comportamiento que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas por acción directa e indirecta, las acciones directas por las cuales las especies de *Trichoderma* controlan el crecimiento de los fitopatógenos son: la competencia, la

antibiosis, la producción de sideróforos y el hiperparasitismo (Hermosa *et al*., 2012; Contreras-Cornejo *et al*., 2016; Li *et al*., 2016). Las respuestas de resistencia sistémica inducida en plantas son uno de los mecanismos indirectos por los cuales *Trichoderma* spp. y ciertas especies de bacteria del género *Bacillus* reducen las enfermedades en las plantas. La inducción de defensa de *Trichoderma* spp. esta asociada en gran medida con la producción de proteínas relacionadas con la patogenicidad como la b-1,3-glucanasa y la enzima de defensa fenilalanina amonio liasa y enzimas oxidativas como la peroxidasa, la polifenol oxidasa y la superóxido dismutasa (Yedidia *et al*., 1999; Ahmed *et al*., 2000; Elad, 2000; Compant *et al*., 2005; Yang *et al*., 2009; Shoresh *et al*., 2010). *Trichoderma* spp. también pueden inducir resistencia sistémica adquirida (SAR), incluso cuando la resistencia sistémica inducida (ISR) está activada y pueden mejorar la resistencia de la planta contra fitopatógenos. Además de proteger las plantas de los organismos nocivos de la rizósfera, *Trichoderma* spp. pueden promover también el crecimiento de las plantas mediante la producción de hormonas de crecimiento vegetal como IAA y GA3 (Cattelan *et al*., 1999; Chen *et al*., 2007; Harman, 2011).

En este estudio, cinco aislados de *Trichoderma* mostraron propiedades antagonistas significativas contra el complejo hongos con origen en el suelo, incluyendo a *F. oxysporum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *S. rolfsii* y S. *sclerotiorum*. *Trichoderma* solo o en combinación con el patógeno aumentó significativamente el crecimiento de los brotes, la raíz y el tallo de las plantas en comparación con el testigo absoluto o con las semillas de garbanzo inoculadas solas con el patógeno (Cuadros 4 y 5). La aplicación de *Trichoderma* spp. en una amplia gama de cultivos como agentes de biocontrol para el manejo de diferentes patógenos se debe a su eficacia en la inhibición del crecimiento y desarrollo de fitopatógenos (Mathys *et al*., 2012; Chowdappa *et al*., 2013). En una investigación realizada por Amin *et al*. (2010), afirmaron que los metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. redujeron eficazmente el crecimiento micelial y la producción de esclerocios en los patógenos.

El buen control que mostró el aislado de *T. longibrachiatum* (FAVF340) contra el complejo de hongos fitopatógenos causantes de la marchitez del garbanzo podría ser apoyado por los procesos de metabolitos volátiles (Cuadros 4 y 5). Pacheco *et al*. (2016) afirmaron

que los metabolitos volátiles de *Trichoderma* spp. son fungistáticos. Varios autores reportaron resultados similares a nuestro trabajo en los cuales *T*. *reesi*, *T*. *harzianum* y *T*. *longibrachiatum* controlaron significativamente a *F*. *oxysporum*, *R*. *solani*, *S*. r*olfsii*, *Colletotrichum capsici*, *S*. *sclerotiorum*, *Helminthosporium oryzae* y *Alternaria brassicicola* en diferentes cultivos de importancia comercial (Amin *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2014; Pacheco *et al*., 2016). Los resultados de nuestro estudio están también concuerdan con el estudio de Zehra *et al*. (2017), quienes mostraron que diferentes cepas de *T*. *harzianum* pudieron controlar la marchitez causada por *F*. *oxysporum* en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*).

A pesar de la falta de información sobre los mecanismos de la promoción del desarrollo de las plantas inducidos por *Trichoderma*, se cree que *Trichoderma* spp. pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes, haciéndolos, más asimilables para las plantas, lo que contribuye en gran medida a la promoción del crecimiento de las plantas (Yadav *et al*., 2009; Kapri y Tewari, 2010; Singh *et al*., 2014). Sridharan *et al*. (2020) confirmaron que una cepa de *T*. *longibrachiatum* mostró propiedades antagonistas significativas contra los patógenos *S*. *rolfsii* y *M*. *phaseolina*. Por otro lado, varios autores informaron que la acidificación por ácidos orgánicos liberados por *T*. *harzianum* proporciona más nutrientes e influye directamente en el crecimiento de las plantas y podría atribuirse a la eficiencia de la fotosíntesis (Kucuk *et al*., 2008; Lorito *et al*., 2010; Lopez-Raez *et al*., 2017). Galletti *et al*. (2019) confirmaron la capacidad antagónica de especies *T*. *gamsii* y *T*. *afroharzianum* evaluados en semillas de maíz contra *Fusarium verticillioides,* lo que resultó en la promoción del crecimiento de las plantas y la inducción de respuestas sistémicas contra el patógeno. Los aislados de *Trichoderma* tienen fuertes efectos antagónicos y micoparasitarios contra los fitopatógenos y, por lo tanto, pueden reducir la severidad de la enfermedad en las plantas (Viterbo y Horwitz, 2010; Elsharkawy *et al*., 2013).

2.6. CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro*, cinco aislados de *Trichoderma* spp. (*T*. *longibrachiatum* FAVF335, *T*. *longibrachiatum* FAVF340, *T***.** *afroharzianum* FAVF345, *T***.** *afroharzianum* FAVF349, *T***.** *afroharzianum* FAVF351) identificados morfológica y molecularmente, redujeron significativamente el crecimiento micelial del complejo de fitopatógenos con origen en el suelo que incluye a, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum,* los cuales están asociados a la marchitez del garbanzo.

En los cultivos duales, los aislados *T*. *longibrachiatum* (FAVF335) y *T*. *longibrachiatum* (FAVF340) mostraron el mayor control sobre los patógenos, y en las pruebas de interacción micelial se observó principios de micoparasitismo de los aislados de *Trichoderma* sobre las hifas de los patógenos. Entretanto, en condiciones de invernadero, los cinco aislados de *Trichoderma* mostraron diferencias significativas en confrontaciones con los patógenos de raíz, sin embargo, también los aislados *T*. *longibrachiatum* (FAVF335) y *T*. *longibrachiatum* (FAVF340) mantuvieron el mayor control del complejo de patógenos asociados a la marchitez del garbanzo. La aplicación de estos aislados en forma de tratamientos de semillas mejoró el desarrollo de la planta.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la inoculación de semillas con especies de *Trichoderma* antes de la siembra accelera el proceso de colonización radicular, es un paso necesario para la activación de los mecanismos de resistencia sistémica inducida, que se reconoce como el principal modo de acción de este microorganismo beneficioso para las plantas. Además de esto, esta alternativa podría contribuir directamente en el cuidado del medio ambiente y la producción de alimento inocuo para el consumo humano.

2.7. LITERATURA CITADA

Abdullah MT, Ali NY and Suleman P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection 27(10): 1354–1359. doi:10.1016/j.cropro.2008.05.007.

Ahmed AS, Sánchez CP y Candela ME. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology 106(9): 817–824. https://doi.org/10.1023/A:1008780022925.

Aloise DLJ, Shende R, Mercado C, Gilfillan C y Kikwe SR. 2001. Floriculture and the environment: Growing flowers without methyl bromide. Ed. United Nations Publication. UNEP DTIE. 125pp.

Archak S, Tyagi RK, Harer PN, Mahase LB, Singh N, Dahiya OP, Bansal KC. 2016. Characterization of chickpea germplasm conserved in the Indian National Genbank and development of a core set using qualitative and quantitative trait data. Crop Journal 4(5): 417–424. https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.06.013.

Bhattacharyya D, Basu S, Chattapadhyay J and Bose S. 1985. Biocontrol of *Macrophomina* root-rot disease of jute by an antagonistic organism, *Aspergillus versicolor*. Plant Soil 87(3): 435–438. Doi: 10.1007/BF02181910.

Bell DK, Well HD, Markhabell DK, Wells CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phythopathology 72: 379– 382.

Benítez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. Int. Microbiol 7(4): 249–260.

Bonanomi G, Lorito M, Vinale F and Woo SL. 2015. Organic amendments, beneficial microbes, and soil microbiota: toward a unified framework for disease suppression. Annual Review of Phytopathology 56(1): 1–20. Doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100046.

Cattelan AJ, Hartel PG and Fuhrmann JJ. 1999. Screening for plant growth–promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Science Society of America Journal 63(6): 1670. Doi:10.2136/sssaj1999.6361670x.

Chávez AN, Romantchick KE, García LC y Velázquez MB. 2009. Desinfección de suelos y sustratos en la agricultura: Métodos y Equipos. Ed. Universidad Autónoma Chapingo. México. 234 p.

Chen XH, Koumoutsi A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süssmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nature Biotechnology 25(9): 1007–1014. Doi: 10.1038/nbt1325.

Chen K y Zhuang, WY. 2016. *Trichoderma shennongjianum* and *Trichoderma tibetense*, two new soil-inhabiting species in the Strictipile clade. Mycoscience 57(5): 311–319. Doi:10.1016/j.myc.2016.04.005.

Chowdappa P, Mohan KSP, Jyothi LM & Upreti KK. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. Biological Control 65(1): 109–117. Doi:10.1016/j.biocontrol.2012.11.009.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C & Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology 71(9): 4951–4959. Doi:10.1128/aem.71.9.4951-4959.2005.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, del-Val E & Larsen J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS Microbiology Ecology 92(4): fiw036. doi:10.1093/femsec/fiw036.

Devasirvatham V, Gaur PM, Mallikarjuna N, Tokachichu RN, Trethowan RM and Tan DKY. 2012. Effect of high temperature on the reproductive development of chickpea genotypes under controlled environments. Functional Plant Biology 39(12): 1009. Doi: 10.1071/fp12033.

Dixit GP, Srivastava AK, Singh NP. 2019. Marching towards self-sufficiency in chickpea. Current Science 116(2): 239-242.

Dubey SC, Suresh M and Singh B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control 40(1): 118–127. Doi:10.1016/j.biocontrol.2006.06.006.

Elad Y y Chet I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica 11(1): 55–58. Doi: 10.1007/bf02980712.

Elad Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protection 19(8-10): 709–714. Doi: 10.1016/s0261-2194(00)00094-6.

El-Debaiky SA. 2017. Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi *in vitro* in comparison with *Trichoderma harzianum*. Microbial Pathogenesis 113: 135–143. Doi:10.1016/j.micpath.2017.10.041.

Elsharkawy MM, Shimizu M, Takahashi H, Ozaki K and Hyakumachi M. 2013. Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1. The Plant Pathology Journal 29(2): 193–200. https://doi.org/10.5423/PPJ.SI.07.2012.01.

Fang X, Turner NC, Yan G, Li F and Siddique KHM. 2009. Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. Journal of Experimental Botany 61(2): 335–345. doi:10.1093/jxb/erp307.

FAO. 2016. Statistical database (Rome, Italy: food and agriculture organization of the United Nations). http//www.apps.fao.org.

Fierros LGA, Ortega MPF, Acosta GJA, Valenzuela HV, Padilla VI, Velarde FS, Gutierres PE. 2016. Interacción genotipo-ambiente en garbanzo blanco de semilla extra grande en el noroeste de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7(3): 507-519. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263145554003

Fierros LG, Acosta GJ, Ortega MP, Padilla VI, Álvarez BA, Ramírez SM and Velarde FS. 2019. Distribución de hongos asociados a pudriciones de raíz del garbanzo. Revista Mexicana de Ciencias Agricolas 10(1): 131-142. https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1730.

Galletti S, Paris R and Cianchetta S. 2019. Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. Microbiological Research, 126406. doi:10.1016/j.micres.2019.126406

Garg R, Bhattacharjee A and Jain M. 2014. Genome-scale transcriptomic insights into molecular aspects of abiotic stress responses in chickpea. Plant Molecular Biology Reporter 33(3): 388–400. Doi: 10.1007/s11105-014-0753-x.

Gaur PM, Krishnamurthy L and Kashiwagi J. 2008. Improving drought-avoidance root traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.) current status of research at ICRISAT. Plant Production Science 11(1): 3–11. Doi:10.1626/pps.11.3.

Gaur PM, Jukanti AK and Varshney RK. 2012. Impact of genomic technologies on chickpea breeding strategies. Agronomy 2(3): 199–221. Doi: 10.3390/agronomy2030199.

Gaur PM, Samineni S, Thudi M, Tripathi S, Sajja SB, Jayalakshmi V. 2019. Integrated breeding approaches for improving drought and heat adaptation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Breeding 138 (4): 389–400. Doi: 10.1111/pbr.12641.

Gveroska B, Ziberoski. 2012. *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against *Alternaria alternata* on tobacco. Applied Technologies and Innovations 7(2): 67–76. DOI: http://dx.doi.org/10.15208/ati.2012.9.

Gómez GRM, Salinas PRA. y Gómez GL. 2003b. Suprema-03, variedad de garbanzo para exportación. SAGARPA-INIFAP-CIRNO-C.E. Valle de Culiacán. Folleto técnico Núm. 25. 15 p.

Harman GE, Petzoldt R, Comis A and Chen J. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 94(2): 147–153. Doi:10.1094/phyto.2004.94.2.147.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158(1):17–25. Doi:10.1099/mic.0.052274-0.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158(1):17–25. Doi:10.1099/mic.0.052274-0

Hewedy OA, Abdel-lateif KS, Bakr RA. 2019. Genetic diversity and biocontrol efficacy of indigenous *Trichoderma* isolates against *Fusarium* wilt of pepper. Journal Basic Microbiology 60 (2): 1–10. https://doi.org/10.1002/jobm.201900493.

Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1): 4–10. Doi:10.1094/pdis.2003.87.1.4.

Hussey RS. 1989. Disease-inducing secretions of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 27(1): 127–141. Doi: 10.1146/annurev.py.27.090189.001011.

Idnurm A and Howlett BJ. 2001. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. Molecular Plant Pathology 2(4): 241–255. doi:10.1046/j.1464-6722.2001.00070.x

Infante D, Martínez B, González N and Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* Frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal 24(1): 14-21.

Jha UC, Chaturvedi SK, Bohra A, Basu PS, Khan MS and Barh D. 2014. Abiotic stresses, constraints and improvement strategies in chickpea. Plant Breeding 133 (2): 163–178. Doi: 10.1111/pbr.12150.

Kapri A y Tewari L. 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. Brazilian Journal of Microbiology 41(3): 787–795. Doi: 10.1590/s1517-83822010005000001.

Kashiwagi J, Krishnamurthy L, Purushothaman R, Upadhyaya HD, Gaur PM, Gowda CLL, Varshney RK. 2015. Scope for improvement of yield under drought through the root traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Research 170(48): 47–54. doi:10.1016/j.fcr.2014.10.003.

Khare E, Kumar S and Kim K. 2018. Correction to: role of peptaibols and lytic enzymes of *Trichoderma cerinum* Gur1 in biocontrol of *Fusarium oxysporum* and chickpea wilt. Environmental Sustainability 303(1): 39–47. Doi: 10.1007/s42398-018-0022-2.

Kucuk C, Kivanc M, Kinaci E, Kinaci G. 2008. Determination of the growth and solubilization capabilities of *Trichoderma harzianum* T1. Biologia 63(2): 167–170. Doi: 10.2478/s11756-008-0045-8

Landa BB, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM. 2004. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. Phytopathology 94(9): 946-960. Doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.9.946.

Leport L, Turner N, Davies S and Siddique K. 2006. Variation in pod production and abortion among chickpea cultivars under terminal drought. European Journal of Agronomy 24(3): 236-246. Doi: 10.1016/j.eja.2005.08.005.

Li Y, Sun R, Yu J, Saravanakumar K & Chen, J. 2016. Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. Indian Journal of Microbiology 56(3): 318–327. Doi: 10.1007/s12088-016-0581-9.

López-Ráez JA, Shirasu K and Foo E. 2017. Strigolactones in plant interactions with beneficial and detrimental organisms: The Yin and Yang. Trends in Plant Science 22(6): 527–537. Doi:10.1016/j.tplants.2017.03.011

Lorito M, Woo SL, Harman, GE and Monte E. 2010. Translational Research on*Trichoderma*: From 'Omics to the Field. Annual Review of Phytopathology 48(1): 395–417. Doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314.

Manganiello G, Sacco A, Ercolano MR, Vinale F, Lanzuise S, Pascale A, Woo SL. 2018. Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. Frontiers in Microbiology 2(9): 1–19. Doi:10.3389/fmicb.2018.01966.

Mantri NL, Ford R, Coram TE and Pang ECK. 2010. Evidence of unique and shared responses to major biotic and abiotic stresses in chickpea. Environmental and Experimental Botany 69(3): 286–292. Doi:10.1016/j.envexpbot.2010.05.003.

Mathys J, De Cremer K, Timmermans P, Van KS, Lievens B, Vanhaecke M, De Coninck B. 2012. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. Frontiers in Plant Science 108(3): 1–26. Doi:10.3389/fpls.2012.00108.

Maurya O and Kumar H. 2018. Growth of chickpea production in India. J. Pharmacogn. Phytochem 7(5): 1175–1177.

Meena M, Swapnil P, Zehra A, Dubey MK and Upadhyay RS. 2017. Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. Archives of Phytopathology and Plant Protection 50(13-14): 629–648. Doi:10.1080/03235408.2017.1357360

Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ariza-Flores R y Barrios-Ayala A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*. Revistsa Chapingo Serie Horticultura 11(2): 273–278.

Millan T, Clarke HJ, Siddique KH, Buhariwalla HK, Gaur PM, Kumar J. 2006. Chickpea molecular breeding: new tools and concepts. Euphytica 147: 81–103. Doi: 10.1007/s10681-006-4261-4.

Mishra DS, Sinha AP. 2000. Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. Tropical Agriculture 77(3):188–191.

Muehlbauer FJ y Singh KB. 1987. Genetics of chickpea. In: M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.). The Chickpea. CAB. International, Wallingford, Oxon, OX10 8DE, UK. 99-125 pp.

Nayyar H, Bains T, Kumar S. 2005. Low temperature induced floral abortion in chickpea: relationship to abscisic acid and cryoprotectants in reproductive organs. Environmental and Experimental Botany 53(1): 39–47. Doi:10.1016/j.envexpbot.2004.02.011.

Nawrocka J y Małolepsza U. 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. Biological Control 67(2): 149–156. Doi:10.1016/j.biocontrol.2013.07.005

Nikam PS, Jagtap GP, Sontakke PL. 2007. Management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. African Journal of Agricultural Research 2(12): 692–697

O'Donnell K, Cigelnik E and Casper HH. 1998. Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungi as *Fusarium venenatum*. Fungal Genetics and Biology 23(1): 57–67. Doi:10.1006/fgbi.1997.1018.

Omann MR, Lehner S, Escobar RC, Brunner K and Zeilinger S. 2012. The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. Microbiology. 158(1): 107–118. https://doi.org/10.1099/mic.0.052035-0.

Ozalkan C, Sepetoglu H, Daur I, Sen O. 2010. Relationship between some growth parameters and grain yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during different growth stages. Turkish Journal of Field Crops 15(1): 79–83.

Pacheco KR, Viscardi BSM, de Vasconcelos TMM, Moreira GAM, do Vale HMM & Blum LEB. 2016. Efficacy of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. reesei* against *Sclerotium rolfsii*. Bioscience Journal 32(2): 412–421. https://doi.org/10.14393/BJ-v32n2a2016-32732.

Paredes-Escalante JE, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Sañudo-Barajas JA, Valdez-Torres JB. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27(1): 27–35.

Paugh KR & Gordon T. 2019. The effect of planting date and inoculum density on severity of *Fusarium* wilt of lettuce in California. Plant Disease 103(3): 1498–1506 Doi: 10.1094/pdis-09-18-1614-re.

Peña LA, Ponce VJJ, Sánchez CF & Magaña LN. 2014. Desempeño agronómico de variedades de tomate de cáscara en invernadero y campo abierto. Revista Fitotecnia Mexicana 37(4): 381-391.

Pinzón Gutiérrez YA, Bustamante SL y Buitrago G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). Revista Colombiana de Biotecnología 11(2): 8-18 pp.

Qiao M, Du X, Zhang Z, Xu JP, Yu ZF. 2018. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China. MycoKeys 44: 63–80. https://doi.org/10.3897/mycokeys.44.30295.

Rawat R y Tewari L. 2011. Effect of abiotic stress on phosphate solubilize ion by biocontrol fungi *Trichoderma* sp. Current Microbiology 62(5): 1521–1526. Doi: 10.1007/s00284-011-9888-2

Ríos VC, Caro CJM, Berlanga RDI, Ruiz CMF, Ornelas PJJ, Salas MMA, Villalobos PE and Guerrero PVM. 2016 Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología 3(12): 84–99.

Sallam NMA, Eraky AMI and Sallam A. 2019. Effect of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* wilt disease of tomato. Molecular Biology Reports 46(1): 1–8. Doi: 10.1007/s11033-019-04901-9

Saha DK, Pan S. 1996. *In vitro* antagonistic potential of different isolates of *Gliocladium virens* of West Bengal. J. Natl. Bot. Soc 50: 13–18.

Saxena A, Raghuwanshi R and Singh HB. 2014. *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. Journal of Basic Microbiology 55(2): 195–206. Doi:10.1002/jobm.201400317.

Sharma M, Kiran BT, Gaur M, Ghosh R, Rameshwar T, Chaudhary RG, Upadhyay JP, Gupta O, Saxena DR, Kaur L, Dubey SC, Anandani VP, Harer PN, Rathore A Pande S. 2012. Identification and multi-environment validation of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea. Field Crops Research 135: 82–88. Doi:10.1016/j.fcr.2012.07.004.

Shoresh M, Harman GE & Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology 48(1): 21–43. Doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450.

Singh F, Diwakar B. 1995. Chickpea botany and production practices. Skill development series no. 16. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India. 1–64 pp.

Singh A, Sarma BK, Singh HB & Upadhyay RS. 2014. *Trichoderma*. Biotechnology and Biology of *Trichoderma* 533–542. doi:10.1016/b978-0-444-59576-8.00040-0.

Sobowale AA, Odebode AC, Cardwell KF, Bandyopadhyay R and Jonathan SG. 2010. Antagonistic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and *T. hamatum* resident on maize (*Zea mays*) plant against *Fusarium verticillioides* (Nirenberg) isolated from rotting maize stem. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(8): 744–753. Doi: 10.1080/03235400802175904.

Sridharan AP, Thankappan SGK and Uthandi S. 2020. Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. Microbiological Research 236: 126436. doi:10.1016/j.micres.2020.126436.

Swathi B, Patibanda AK, Prasuna RP. 2015. Antagonistic efficacy of *Trichoderma* species on *Sclerotium rolfsii in vitro*. Journal of Agriculture and Veterinary Science 522 (101): 19–22.

Tchameni SN, Cotârlet M, Ghinea IO, Bedine MAB, Sameza ML, Borda D, Bahrim G, Dinica RM. 2019. Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. International Microbiology 23(2): 179–188. Doi: 10.1007/s10123-019-00089-x.

Van der Maesen LJG. 1987. *Cicer* L. origin, history and taxonomy of chickpea. *In:* The Chickpea. Saxena M. C. and K.B. Singh (Eds.). C.A.B. International Cambrian News Ltd, Aberystwyth, UK. 11–34 pp.

Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG. 2013. Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum* L.) provides a resource for trait improvement. Nature Biotechnology 31(3): 240–246. Doi: 10.1038/nbt.2491.

Vásquez LA, Tlapal BB, Yáñez MMJ, Pérez PR and Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del chile de agua (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana 32(2): 127–134.

Velázquez MB, Gracia LC, Jordá C, Savall P. 2003. Tratamiento de sustratos destinados a semilleros por radiación de microondas. Phytoma 149: 43–46.

Vey A, Hoagland RE, Butt TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *In:* Butt TM, Jackson C, Magan N (Eds.) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Bristol 311–346.

Viterbo A and Horwitz BA. 2010 Mycoparasitism. *In:* Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Borkovich, K.A. and Ebbole, D.J. (Eds.), Washington: American Society of Microbiology 676–693.

Wang J, Gan YT, Clarke F, McDonald CL. 2006. Response of chickpea yield to high temperature stress during reproductive development. Crop Science 46(5): 2171–2178. Doi:10.2135/cropsci2006.02.0092.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In:* PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (Eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

Yadav RL, Shukla SK, Suman A, Singh PN. 2009. *Trichoderma* inoculation and trash management effects on soil microbial biomass, soil respiration, nutrient uptake and yield of ratoon sugarcane under subtropical conditions. Biol. Fertil. Soils 45(5): 461-468. Doi: 10.1007/s00374-009-0352-4.

Yang HH, Yang SL, Peng KC, Lo CT and Liu SY. 2009. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. Mycological Research 113(9): 924–932. doi:10.1016/j.mycres.2009.04.004.

Yedidia I, Benhamou N and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65(3): 1061–1070. Doi:10.1128/aem.65.3.1061-1070.1999.

Zehra A, Meena M, Dubey MK, Aamir M and Upadhyay RS. 2017. Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against Fusarium wilt disease. Botanical Studies 58(1): doi: 10.1186/s40529-017-0198-2

Zeilinger S, Gruber S, Bansal R & Mukherjee PK. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma*– Chemistry meets genomics. Fungal Biology Reviews 30(2): 74–90. Doi:10.1016/j.fbr.2016.05.001.

Zhang F, Yang X, Ran W and Shen Q. 2014. *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianumT*-E5. FEMS Microbiology Letters 359(1): 116–123. Doi:10.1111/1574-6968.12582.