

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.**

**ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE
MICROORGANISMOS PARA EL CONTROL DEL
COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA
RABIA DEL GARBANZO**

POR:

JESÚS EDÉN PAREDES ESCALANTE

TESIS APROBADA POR LA

**UNIDAD CULIACÁN DEL CIAD EN CIENCIA Y TECNOLOGIA PARA
PRODUCTOS AGRICOLAS DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA

AGOSTO DE 2007

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignado para revisar la tesis del Ing. Jesús Edén Paredes Escalante, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en ciencias.



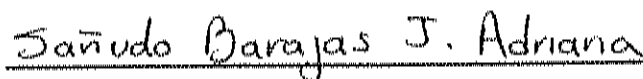
MC. José Armando Carrillo Fasio
Director de Tesis



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Asesor



Dr. José Benigno Valdez Torres
Asesor



MC. Josefa Adriana Sañudo Barajas

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de tesis.

Dr. Alfonso Gardea Béjar

Director General

DEDICATORIA

ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A LO MÁS HERMOSO QUE ME HA DADO
LA VIDA

MI ESPOSA

Y

MIS HIJOS;

Edén y Rosita

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis MC. José Armando Carrillo Fasio y asesores Dr. Raymundo Saúl García Estrada, Dra. J. Adriana Sañudo Barajas y Dr. José Benigno Valdez Torres por su gran disposición en todo momento que se requirió de su ayuda y orientación.

Un especial agradecimiento a la MC. Verónica Pérez Rubio, MC. Rosabel Vélez, Dr. Raúl Allende Molar, Ing. Isidro Márquez y al Ing. Luis Pérez por el apoyo técnico y académico otorgado en la realización del presente trabajo.

A los maestros del CIAD por ser parte de mi formación: Dra. María Dolores Muy Rangel, Dr. Tomás Osuna Enciso, Dr. Jorge Humberto Siller Cepeda, Dra. Josefina León Félix, Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante, MC. Manuel Alonso Báez Sañudo, Dr. Basilio Heredia, Dr. Cristóbal Cháidez Quiroz y Dr. Felipe Peraza.

Al personal técnico y administrativo del CIAD por su colaboración; MC. Eduardo Sánchez, MC. Werner Rubio, Ing. Evelia Araiza, MC. Laura Contreras, Ing. Rosalba Contreras.

A Víctor Gurrola Rochín y Brissa Plata Vargas por su ayuda en el trabajo de campo y laboratorio.

A mis amigos y compañeros de generación; Cecy, Saúl, Aída, Joane, Domingo y Ariel.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Unidad Culiacán, por brindarme la oportunidad y el espacio para formarme como Maestro en Ciencias en sus aulas y laboratorios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado a través del programa de formación de científicos y tecnólogos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo con recursos económicos hacia este proyecto, a través del fondo sectorial: SAGARPA - 2003-C01-53.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
HIPÓTESIS.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
Origen e Historia del Garbanzo.....	7
Importancia Económica y Nutricional.....	7
Aspectos Agronómicos.....	8
Suelos.....	8
Fecha de Siembra.....	9
Plagas.....	9
Enfermedades.....	9
Enfermedad de la Rabia.....	10
Sintomatología de la Rabia.....	10
Control de la Rabia del Garbanzo.....	12
Microorganismos Antagonistas.....	12
<i>Bacillus subtilis</i>	14
<i>Bacillus</i> en el Control Biológico de Fitopatógenos.....	16

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17
<i>Pseudomonas fluorescens</i> en el Control Biológico de Fitopatógenos.....	20
<i>Glomus intraradices</i>	21
<i>Trichoderma</i> spp.	23
Quitinasas	26
Glucanasas	28
BIBLIOGRAFÍA.....	30
CAPÍTULO 1	
Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo en el Estado de Sinaloa	
RESUMEN	38
ABSTRACT.....	38
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
Aislamiento de Antagonistas y Patógenos	41
Selección e Identificación de Antagonistas	42
Evaluación en Campo de los Antagonistas Seleccionados.....	43
Colonización de las Raíces por los Agentes de Control Biológico.	44
Determinación de Severidad de la Enfermedad.....	45
Análisis Estadísticos.....	45
RESULTADOS.....	46
Aislamiento e Identificación de Microorganismos Antagonistas	46
Colonización de la Rizosfera por los Agentes de Control Biológico	46
DISCUSIÓN	48

BIBLIOGRAFÍA.....	51
CAPÍTULO 2	
Quitinasas y β -1,3-Glucanasas de <i>Trichoderma</i> spp. Relacionadas con el Micoparasitismo Sobre <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> .	
RESUMEN.....	54
ABSTRACT.....	54
INTRODUCCIÓN.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
Aislamiento de Antagonistas y Patógenos.....	57
Selección e Identificación de Antagonistas.....	57
Inducción de Producción de Enzimas.....	58
Actividad Enzimática por Difusión en Agar.....	59
Obtención de Pared Celular de Hongos Patógenos.....	59
Inducción Enzimática en Condiciones Simuladas de Micoparasitismo.....	60
Actividad Enzimática.....	60
Análisis Estadísticos.....	61
RESULTADOS.....	61
Selección e Identificación de Antagonistas.....	61
Evaluación Enzimática en Placa.....	62
Actividad Enzimática en Condiciones Simuladas de Micoparasitismo.....	63
DISCUSIÓN.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dosis de la combinación de antagonista	44
Cuadro 2. Inhibición del desarrollo micelial de los patógenos	46
Cuadro 3. Colonización de los antagonistas en la raíz de garbanzo.	47
Cuadro 4. Severidad de la enfermedad en las tres evaluaciones	48
Cuadro 5. Inhibición del desarrollo micelial de los patógenos por las cepas de <i>Trichoderma</i> expresado en porcentaje..	62
Cuadro 6. Unidades de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa y proteasa de los filtrados de cultivos de las cepas de <i>Trichoderma</i>	63
Cuadro 7. Efecto de la fuente de pared celular sobre la actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa de la cepa de <i>T. lignorum</i> CIAD 06 540903 en condiciones simuladas de micoparasitismo.....	64
Cuadro 8. Coeficiente de correlación de pearson (r) entre su actividad enzimática de extractos de cultivo de las cepas de <i>Trichoderma</i> y su habilidad para inhibir el crecimiento micelial de los patógenos <i>in vitro</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación entre la habilidad de las cepas de <i>Trichoderma</i> para inhibir <i>in vitro</i> el crecimiento de <i>S. rolfsii</i> y su actividad quitinasa en placa.	66
--	----

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la efectividad biológica de microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo, se estableció un estudio que fue dividido en dos experimentos. El primer experimento se condujo a nivel de campo y fue establecido para evaluar la eficacia de combinaciones de antagonistas en el control de la "marchitez o rabia" del garbanzo. Se utilizaron cepas nativas identificadas como *Trichoderma lignorum* (CIAD 06-540903), *Trichoderma Harzianum* (CIAD 05-550903), *Bacillus subtilis* (CIAD-940111) y *Pseudomonas fluorescens* (CIAD-990111) y una cepa comercial de *Trichoderma Harzianum* (T-22). Para la evaluación, los antagonistas fueron combinados con *Glomus intraradices* y su efectividad se comparó contra un tratamiento químico (PCNB) y un testigo absoluto. Los tratamientos se aplicaron a la semilla previo a la siembra y se evaluó la severidad de la enfermedad cada 15 días a partir de la siembra y el índice de colonización a los 45 días. La colonización de *T. Harzianum* CIAD 05-550903-G. intraradices fue de 3.3×10^3 ufc/g de raíz fresca-75%, respectivamente. En *B. subtilis*-G. intraradices fue de 1.3×10^8 ufc/g de raíz fresca-75%, mientras que en la combinación *P. fluorescens*-G. intraradices fue de 1.4×10^7 ufc/g de raíz fresca-88%, respectivamente; mismas que presentaron una mayor reducción de la severidad de la enfermedad en 64, 57 y 51%, respectivamente en comparación con el testigo.

El segundo experimento se realizó bajo condiciones in vitro, donde se evaluó la efectividad de seis cepas nativas de *Trichoderma*, (2 *T. viridae*, 2 *T. lignorum* y 2 *T. harzianum*) en el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial de *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. Adicionalmente se evaluó la actividad de las enzimas quitinasa, glucanasa y proteasa en relación con la actividad inhibitoria de las cepas nativas de *Trichoderma*. La cepa *T. lignorum* (CIAD 06-540903), presentó el mayor porcentaje de Inhibición de todos los patógenos y la mayor actividad quitinasa y glucanasa, por lo que se seleccionó para evaluar en condiciones simuladas de micoparasitismo la influencia de la pared celular de *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani* en su capacidad de expresión quitinasa y glucanasa, se utilizó dextrosa como control. Se presentó una mayor actividad glucanasa en los medios de cultivo enriquecidos con pared celular con respecto al control; en contraste, no se presentaron diferencias significativas en la actividad quitinasa, sin embargo la mayor actividad fue influenciada por la pared celular de *R. solani* con 1.15 unidades.

actividad glucanasa en los medios de cultivo enriquecidos con pared celular con respecto al control; en contraste, ¹¹⁰ se presentaron diferencias significativas en la actividad quit.inasa, sin embargo la mayor actividad fue Influenciada por la pared celular de R ~~sol~~:111/ con 1.15 unidades,

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa de grano seco que se cultiva alrededor del mundo, sólo después del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Hervás *et al.*, 1997). En México, se encuentra ampliamente disperso y adaptado, por lo cual se ubica entre los primeros cinco países productores y exportadores de esta leguminosa en el mundo y el número uno de América, con un aporte del 3% de la producción mundial (ICRISAT, 2004). La superficie nacional en promedio en los últimos cinco años fue de 136,915 ha, con una producción anual de 132,800 toneladas (FAO, 2002), lo que supone un rendimiento unitario muy cercano a 1.0 ton/ha y una valor aproximado de 66.4 millones de dólares.

El garbanzo blanco para exportación, tradicionalmente se ha cultivado en los estados del noroeste de México, donde Sinaloa representa al principal estado productor y exportador de esta leguminosa la cual se destina para el consumo humano, y es uno de sus cultivos más importantes, sólo después del maíz, frijol y algunas hortalizas (INIFOAGRO, 2005). En el ciclo agrícola 2004-2005 se cultivaron 36,768 ha de garbanzo en Sinaloa con una producción de 55,735 toneladas y con un valor de cerca de 480 millones de pesos (SAGARPA, 2004).

Al igual que la gran mayoría de las plantas cultivadas, el garbanzo es susceptible a un gran número de plagas y enfermedades. Dentro de estas últimas destaca la marchitez o rabia del garbanzo, ocasionada por el complejo de hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, principalmente (García *et al.*, 2004). La importancia de esta enfermedad radica en que limita la superficie destinada a la siembra de este cultivo, y además causa la muerte de plantas y por ende el daño es directo al rendimiento. Las pérdidas anuales en campo ocasionadas por enfermedades radiculares en garbanzo varían entre un 10 y 40%, pero pueden llegar a destruir un cultivo bajo ciertas condiciones específicas (Landa *et al.*, 2004a).

En el control de enfermedades, el uso de variedades resistentes es una de las principales prácticas con relación a la estrategia costo-beneficio; sin embargo, la eficiencia de estos cultivares resistentes es limitado debido a la variabilidad en las poblaciones de los patógenos (Jiménez-Gasco *et al.*, 2004). Así mismo, el uso de agroquímicos no proporciona un control efectivo, debido principalmente a las estructuras de resistencia de estos fitopatógenos, por lo cual se hace necesaria la búsqueda de otras alternativas de control.

El control biológico es una estrategia prometedora para el manejo de las enfermedades radicales y foliares en un amplio rango de cultivos. La efectividad de este método no depende solamente de un microorganismo antagonista adecuado, sino además de una estrategia para introducir y mantener sus niveles de población, así como la actividad de estos microorganismos en asociación con la planta (Lo *et al.*, 1997). Microorganismos antagonistas como bacterias y hongos han sido estudiados para el control de enfermedades desde hace aproximadamente 70 años (Landa *et al.*, 2004b). Dentro de estos microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* spp., y algunas especies de micorriza del género *Glomus*, han sido evaluados como antagonistas de hongos patógenos, debido a su diversidad de mecanismos de acción, los cuales pueden ser por competencia por espacio y nutrientes, antibiosis o micoparasitismo (Whipps, 2001).

La mayoría de las raíces de las plantas pueden desarrollar una asociación simbiótica con los hongos micorrízicos-vesículo-arbusculares (V-A). Estos son hongos biotróficos obligados que pueden estimular el crecimiento y desarrollo de la planta al mejorar su nutrición (Estañol-Botello *et al.*, 1998); así mismo, pueden ser usados como agentes biocontroladores de enfermedades radicales al igual que diversas bacterias y hongos antagonistas de patógenos (Akkopru y Demir, 2005).

Dentro de los mecanismos de acción de los antagonistas que ejercen el control de los patógenos, el micoparasitismo de *Trichoderma* ha sido relacionado como el principal mecanismo de control. Este micoparasitismo se encuentra en parte mediado por

enzimas (quitinasas y glucanasas) que degradan la pared celular compuesta principalmente por quitina y β ,1-3 glucanos (Harman, 2005). Las etapas del proceso del micoparasitismo incluyen un crecimiento directo (reconocimiento) hacia el patógeno; ataque y enrollamiento de la hifa; y la producción de un amplio rango de enzimas extracelulares (Harman *et al.*, 2004). Estas enzimas actúan al azar sobre los enlaces glucosídicos internos entre las unidades que forman las moléculas de polisacáridos o removiendo el extremo no reductor del polisacárido, por lo que son sinergistas en su actividad, así como son fuertemente sinergistas en su actividad antifungal cuando son aplicadas en conjunto con algún fungicida químico que afecte la membrana celular del patógeno (Lorito *et al.*, 1995).

El sistema de quitinasas del agente de biocontrol *T. harzianum* está compuesto de dos β -1,4-acetilglucosaminadasas (EC 3.2.1.30) y de cuatro endoquitinasas (EC 3.2.1.14). La expresión de estas enzimas durante el micoparasitismo está regulada de una manera muy específica por el tipo de hospedero a antagonizar (Haran *et al.*, 1996). Por ello, la producción de enzimas extracelulares de *Trichoderma* esta influenciada por la fuente de carbono incorporada en el medio de cultivo (El-Katatny *et al.*, 2000); además, el nivel de actividad quitinasa y glucanasa producido por *Trichoderma* es proporcional a la cantidad de sustrato presente en el hospedero; así mismo, esta cantidad de sustrato determinará la susceptibilidad del patógeno a ser micoparasitado (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998).

Diversos estudios se han enfocado en investigar un posible sinergismo de *Glomus* spp. con algunas rizobacterias y con *Trichoderma* spp. para el control de las enfermedades radicales, pero pocos estudios avalan su efectividad contra la rabia del garbanzo. Para llevar a cabo un control biológico eficiente de los patógenos causantes de la rabia, es necesario conocer el potencial inhibitorio de cepas nativas antagonistas del género *Trichoderma* contra estos patógenos *in vitro*; así como, el papel de enzimas quitinasas y glucanasas como mecanismos de micoparasitismo las cuales pueden ser evaluadas bajo condiciones simuladas *in vitro*.

El objetivo general de este trabajo, fue evaluar la efectividad biológica de cepas de antagonistas en asociación con *G. intraradices* en el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo; así como determinar la capacidad de actividad quitinasa, glucanasa y proteasa en cepas nativas de *Trichoderma* spp., y su relación con el grado de biocontrol de los patógenos causantes de la rabia *in vitro*.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Mediante un trabajo experimental, se evaluó el efecto de tratamientos a base de combinaciones de *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* con el hongo micorrízico *Glomus intraradices* para reducir la severidad de la rabia del garbanzo en la variedad blanco Sinaloa, en la zona de Angostura, Sinaloa. Se realizaron evaluaciones de las poblaciones de antagonistas en la raíz y evaluaciones periódicas de la severidad de la enfermedad, en el ciclo agrícola 2005-2006.

Así mismo, en este mismo periodo en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., se evaluaron seis cepas nativas de *Trichoderma* spp. en condiciones *in vitro* para determinar su capacidad inhibitoria contra los patógenos causantes de la rabia del garbanzo y la relación de su actividad quitinasa, glucanasa y proteasa con el grado de inhibición. La cepa con la mayor correlación inhibición-actividad enzimática, se seleccionó para evaluar la influencia de la pared celular de *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani* en su expresión enzimática bajo condiciones de simulación de micoparasitismo.

JUSTIFICACIÓN

La rabia del garbanzo es la principal enfermedad que afecta la siembra y producción de garbanzo en el estado de Sinaloa, y en la actualidad no existe un método de control eficiente que disminuya su severidad, por lo cual se hace necesaria la búsqueda de un método biológico para lograr disminuir su incidencia y severidad.

Así mismo, es importante conocer la capacidad inhibitoria que pueden presentar cepas nativas de *Trichoderma* spp., hacia los diferentes patógenos causantes de la rabia y la relación de la actividad quitinasa, glucanasa y proteasa con el grado de antagonismo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de combinaciones de los antagonistas: *Glomus* sp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma* spp., como supresores del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo.

Conocer la capacidad inhibitoria de diferentes cepas de *Trichoderma* spp., contra los patógenos causantes de la rabia y su capacidad de actividad quitinasa y glucanasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la efectividad biológica (incidencia y severidad) de los antagonistas.

Determinar la colonización de los microorganismos antagonistas en la raíz y rizosfera de garbanzo.

Evaluar el potencial de las cepas de *Trichoderma* spp., en el grado de inhibición de los patógenos de la rabia del garbanzo *in vitro*.

Determinar la actividad quitinasa y glucanasa en las cepas de *Trichoderma* spp., y su relación con el grado de control *in vitro*.

HIPÓTESIS

Los tratamientos a partir de microorganismos antagonistas reducen la incidencia y severidad de la rabia del garbanzo.

Los microorganismos antagonistas tienen la capacidad de colonizar la rizosfera y raíz de todos los tratamientos.

Las cepas nativas de *Trichoderma* presentan diferentes niveles de inhibición micelial en los patógenos causantes de la rabia del garbanzo.

En las cepas nativas de *Trichoderma* spp., su actividad quitinasa y glucanasa ésta relacionada con su capacidad de inhibición de los patógenos de la rabia del garbanzo.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen e Historia del Garbanzo

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) fue de las primeras leguminosas domesticadas en el viejo mundo. Evidencias arqueológicas encontradas por varios investigadores que datan del año 1400 al 2000 A.C., indican que ya se utilizaba como alimento y como ofrenda. Según Vavilov (1926) los centros de origen son la Cuenca Oriental del Mediterráneo y Etiopía. De acuerdo a Van Der Maesen (1972) esta planta se originó en el Sureste del Cáucaso y Noreste de Persia; sin embargo, según Ladizinski (1975) el origen se ubica en el Sureste de Turquía. De allí, las especies se dispersaron primero en Asia (India), Europa y más recientemente a África, Oceanía y América. Los españoles fueron quienes introdujeron el garbanzo a nuestro país, durante la conquista y la colonización de México. En el siglo XVI los españoles y portugueses lo introdujeron a América Central y Sudamérica donde encontró condiciones ambientales favorables para su rápida expansión, sobre todo en México, donde llega a constituir un producto de gran importancia en su balanza comercial. Más recientemente este cultivo ha experimentado un notable desarrollo en el sur de Estados Unidos, con rendimientos muy elevados (Ruiz, 1989).

Importancia Económica Y Nutricional.

La superficie mundial de garbanzo supera las 10 millones de hectáreas, de las cuales el 64% se concentran en la India, seguido por Turquía con el 8%, Paquistán el 7%, Irán y México con el 3% cada uno (ICRISAT, 2004). Los estados del noroeste de México como son Sonora, Baja California Sur y Sinaloa son sus principales productores, siendo éste último el que ha aportado más del 50% de la producción nacional en la

última década, lo cual ha representado un promedio anual de ingresos de 525 millones de pesos al estado en este mismo periodo (SAGARPA, 2004).

La proteína de garbanzo es considerada como la de mayor valor biológico entre las leguminosas de grano de consumo humano (Ruiz, 1989). Además tiene una de las composiciones alimenticias más altas de cualquier legumbre comestible seca. En promedio la semilla de garbanzo contiene un 23 % de proteína, 64 % de carbohidratos totales de los cuales el 47 % es almidón, 5 % de grasa, 6 % de fibra cruda y 3 % de cenizas solubles. En componentes minerales es alto en fósforo con 340 mg/100g, calcio 190/100 g, magnesio 140 mg/100g, hierro 7 mg/100g y zinc 3 mg/100g, además es alto en ácidos grasos no saturados (ICRISAT, 2004).

Aspectos Agronómicos

La productividad de cualquier especie va a depender de su potencial genético, del ambiente en que se desarrolle y su interacción con el medio ambiente, así como la aplicación de tecnología, métodos de labranza adecuados, una adecuada fertilización y protección de los cultivos.

Suelos

El garbanzo puede crecer en un amplio rango de suelos; sin embargo, los franco arcillosos son los idóneos para su cultivo con pH entre 6 y 9, con niveles bajos de yeso pues afecta drásticamente la calidad del grano (Ruiz, 1989). En Sinaloa, más del 80% del garbanzo se siembra en tipo de suelo arcilloso, tanto en riego como temporal pero también es posible su siembra en suelos de aluvión, siempre y cuando no sea este demasiado arenoso (INIFAP, 1998). El garbanzo es muy sensible a problemas de salinidad y alcalinidad, así como a una pobre aireación del suelo (Ruiz, 1989).

Uno de los aspectos más importantes que se deben de tener en cuenta sobre el terreno es que debe de estar lo más nivelado posible, dado que la planta de garbanzo

presenta estrés al disminuir drásticamente el movimiento de nutrientes por el exceso de humedad de lluvias y/o riegos de auxilio, lo que propicia decremento en su desarrollo y predisposición a las enfermedades de la raíz (INIFAP, 1998).

Fecha de Siembra

La época de siembra es un factor importante en cualquier cultivo, pues de ella depende el buen desarrollo de la planta, la obtención de óptimos rendimientos, la calidad del producto, así como el posible escape a enfermedades y plagas. El mayor rendimiento se presenta cuando la siembra se realiza en el mes de Noviembre; sin embargo, en el estado de Sinaloa la siembra se puede ampliar desde el 15 de Octubre al 30 de Diciembre bajo condiciones de riego. La población promedio debe de ser de 8 a 10 plantas por metro lineal, la mayor parte de la superficie cultivada es de humedad residual. Uno de los aspectos agronómicos más importantes son sus necesidades nutrimentales; la demanda de N puede ser entre 40-100 kg/ha y de P de 40-50 kg/ha, principalmente (INIFAP, 1998).

Plagas

La importancia de las plagas en el garbanzo es de menor impacto que las enfermedades, ya que no presenta un cuadro grande de insectos que lo invadan, tal vez por la exudación de parte de la planta de sustancias ácidas, sobre todo de ácido málico, que repelen el contacto con el insecto (Ruiz, 1989). Aun así, entre las plagas del garbanzo se encuentran algunos gusanos trozadores como *Agrotis ipsilon*, y *Feltia subterranea*, el minador de la hoja *Liriomyza sp*, el gusano soldado *Spodoptera exigua* y el gusano de la cápsula del cual se presentan dos especies *Heliothis virescens* y *H. zea* (INIFAP, 1998).

Enfermedades

Más de 50 patógenos han sido citados como capaces de atacar al garbanzo, pero tan solo unos pocos pueden llegar a provocar efectos devastadores. En el ámbito

mundial son sin duda dos las enfermedades más importantes, la secadera causada por *Ascochyta rabiei* Pass y la enfermedad de la rabia.

Enfermedad de la Rabia.

La rabia o marchitez es la enfermedad de mayor importancia a escala regional, se origina en el suelo y es causada por un complejo de hongos (INIFAP, 1998). Los patógenos involucrados en este complejo son: *Fusarium solani* (Mart) Apple and Wr., *F. oxysporum* Schleht f. sp. *ciceris*, *Rhizoctonia solani* Kuehn, *Macrophomina phaseolina* (Maubl) Ashley y *Sclerotium rolfsii* Sacc; por su patogenicidad todos son importantes, ya que en forma individual son capaces de causarle la muerte a la planta (García et al., 2004).

Sintomatología de la Rabia

Esta enfermedad se puede observar durante todo el ciclo del cultivo, ya que los hongos que la causa son un complejo que puede atacar en cualquiera de las etapas de desarrollo de la planta. *R. solani* tiene preferencia por la etapa de plántula, *M. phaseolina* por la madurez fisiológica y los del género *Fusarium* y *Sclerotium* por cualquiera de las fases de desarrollo del cultivo (INIFAP, 1998). Para establecer criterios de diferenciación entre cada patógeno es importante la sintomatología de cada uno de los integrantes de este complejo.

Fusarium solani. Causa la marchitez descendente, la cual se inicia con un cambio en la coloración de verde oscuro a verde pálido en las hojas de la parte alta de la planta, acompañado por una flacidez que va de arriba hacia abajo hasta quedar la planta completamente marchita. En un corte transversal del tallo se observa la médula o parte central del mismo completamente oscura, debido al necrosamiento de los vasos conductores que componen el floema (INIFAP, 1998).

Fusarium oxysporum. Es el causante de la marchitez ascendente; los síntomas se inician en las hojas de la parte baja de la planta, se observa una clorosis de color amarillo opaco que posteriormente se torna brillante, esto se puede presentar en una o más ramas de abajo hacia arriba, hasta quedar la planta completamente amarilla y producir la muerte. En el tallo al hacer un corte transversal se distingue un anillo de color oscuro que rodea a la parte central del tallo de apariencia sana. Este color oscuro es debido al necrosamiento de los vasos conductores del xilema. Tanto *F. solani* como *F. oxysporum*, son la principal causa de muerte de plantas en las primeras etapas de desarrollo y al inicio de la floración, aunque su efecto puede manifestarse durante todo el ciclo del cultivo (INIFAP, 1998).

Rhizoctonia solani. Es la fuente de la pudrición radicular, causa la muerte principalmente de plántulas y en condiciones de alta humedad en el suelo puede afectar plantas de 30 a 40 días de edad. La característica principal de la pudrición es la presencia de una lesión alargada hundida de color café-rojizo a nivel del cuello de la raíz, aunque también se puede presentar en las ramas más viejas de la planta (INIFAP, 1998).

Sclerotium rolfsii. Causa marchitez en plántulas infectadas, adelgazamiento de la raíz principal y en un estado avanzado de infección presenta una pudrición o ahorcamiento del tallo. Cuando se presenta en las etapas de floración y llenado de grano, la planta se seca y no tira la hoja. En la parte lesionada del tallo o en el suelo alrededor del mismo se puede observar un algodoncillo fibroso con gránulos de color crema o pajizo cuando están inmaduros y café oscuro cuando maduran (INIFAP, 1998).

Macrophomina phaseolina. Este hongo es causante de la pudrición seca o carbonosa, la cual se presenta en plantas adultas, debido a que en esta etapa de desarrollo coincide con los periodos cálidos y secos de la región. Las plantas infectadas se secan completamente y adquieren una coloración pajiza y en ocasiones puede presentar un color oscuro debido a la invasión del hongo. Una planta afectada por este patógeno se desprende fácilmente debido a la pudrición de la raíz, al hacer un corte en

el tallo se observa una coloración oscura en todo el tejido, y dentro de éste, unos puntos negros, los microesclerocios, que son las estructuras de resistencia del hongo (INIFAP, 1998).

Control de la Rabia del Garbanzo

El control de esta enfermedad es un tanto difícil por la complejidad del agente causal y hasta ahora su manejo se ha enfocado en el uso de productos químicos, basado en la facilidad de aplicación y eficiencia a corto plazo. Sin embargo, la generación de residuos de pesticidas en los alimentos y el perjuicio de su utilización excesiva en los ambientes edáficos, acuáticos y aéreos, han guiado a la búsqueda de alternativas de control (Landa *et al.*, 2002). El uso de variedades resistentes es una de las estrategias más comunes en el manejo de la rabia del garbanzo. Sin embargo, la resistencia a esta enfermedad puede ser seriamente limitada por la variabilidad en las especies de patógenos, incluyendo la existencia de razas de patógenos o patotipos (Jiménez-Gasco, 2004). Considerando que el control de esta enfermedad requiere de la aplicación de todas las estrategias disponibles, económicas, seguras y compatibles entre sí, el uso de microorganismos antagonistas de los patógenos causantes de la rabia del garbanzo representa una buena alternativa de control de la enfermedad (Landa *et al.*, 2002).

Microorganismos Antagonistas

Diversas investigaciones han demostrado que el control biológico a través del uso de hongos y bacterias benéficas, es una alternativa potencial al uso de fungicidas y/o fumigantes (Kaur y Muthamilan, 1992). Para llevar a cabo un empleo eficiente del control biológico se requiere conocer los factores que influyen sobre el grado de protección conferido por dichos microorganismos (Whipps, 2001). La identificación de microorganismos antagonistas eficientes representa solo el primer paso para el

desarrollo de una estrategia efectiva de control biológico de una enfermedad, ya que este debe de estar ecológicamente adaptado a sobrevivir en el medio ambiente donde debe actuar, llegar a establecerse en él, colonizar de manera efectiva los nichos donde debe ejercer su acción, competir y suprimir al patógeno, y realizar su función dentro de las condiciones particulares del ecosistema donde se aplique, interactuando con todos los componentes del medio. Determinar el momento, el lugar y las condiciones ambientales donde se deben aplicar los agentes de control biológico puede ser más importante que la cantidad a utilizar (Landa *et al.*, 2002).

Un gran número de especies antagonistas de diferentes géneros como son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y algunas especies del género *Glomus*, han proporcionado buenos resultados en el control de enfermedades de una gran diversidad de cultivos. Los modelos específicos de acción que involucran la supresión de parte de los antagonistas contra patógenos pueden ser: antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, inducción de resistencia sistémica y/o localizada, promoción del crecimiento de la planta, así como micoparasitismo (Whipps, 2001).

La mayoría de las interacciones consideradas hasta ahora están enfocadas a un solo patógeno y a un solo agente de biocontrol; de tal manera que la selección de agentes para el control de enfermedades radiculares se ha basado en el uso de agentes individuales. Sin embargo, parece factible que incrementando el número de agentes de biocontrol con el uso combinado de diferentes especies puede resultar en tratamientos de alta persistencia en la rizosfera, con amplios mecanismos de control y con mayor resistencia a las condiciones ambientales. Por ello, una de las estrategias recientemente exploradas para lograr un mejor control de los patógenos en la rizosfera, ha sido la combinación de especies antagonistas, sobre todo si estas exhiben un mecanismo de acción diferente, al igual que diferentes necesidades de espacio y habilidad para colonizar la raíz (Whipps, 2001).

Bacillus subtilis

Las especies de *Bacillus* son los tipos de bacterias más comúnmente aislados de muestras de suelo y pueden representar hasta un 3% de la población bacteriana (Kilian *et al.*, 2000). Su integración como agentes de control biológico basado en la inducción de resistencia en plantas han probado ser exitosas en el manejo de varias enfermedades (Jacobsen *et al.*, 2004). Las especies de *Bacillus* ofrecen varias ventajas ya que pueden ser inoculadas en la semilla, presentan una larga vida por su habilidad de formar esporas y producen antibióticos de amplio espectro. *Bacillus subtilis* es una de las especies más conocidas por su capacidad de inhibir patógenos, al igual que muchas otras han sido reportadas como bacterias que incrementan el rendimiento cuando son inoculadas en la semilla de varios cultivos (Kim *et al.*, 1997a).

Numerosos mecanismos parecen implicados en la capacidad biocontroladora de *B. subtilis* y éstos pueden contribuir en diferente grado en la reducción de las enfermedades y en el aumento en los rendimientos, aunque esto depende en gran medida de la planta, las condiciones ambientales y la forma de aplicación. Los efectos más visibles de la bacteria son sobre los patógenos que atacan la raíz y puede ser debido a que todos los mecanismos por los cuales *Bacillus* lleva a cabo el biocontrol de patógenos son capaces de operar en el área de la raíz.

Competencia por espacio y nutrientes. Ya que las raíces presentan solamente una capacidad limitada para albergar a un cierto tamaño de población y de ciertas especies de microorganismos, la habilidad por ocupar estos espacios de parte de los antagonistas determina el éxito en el control de los patógenos del suelo. Entre los mecanismos empleados por *Bacillus* para su actividad de biocontrol se encuentran la competencia basada en la colonización de la rizosfera y rizoplanos. La capacidad de *Bacillus* para colonizar la raíz ha sido ampliamente demostrada, ya que al ser aplicado a la semilla llega a formar una película de bacterias con una densidad de 0.4 a 0.8mm alrededor de la raíz. El ápice de la raíz es la zona fisiológicamente más activa ya que libera una gran cantidad de exudados y son preferentemente colonizados por *Bacillus* (Kilian *et al.*, 2000). Algunas especies de *Bacillus* pueden presentar grandes

poblaciones en la rizosfera de trigo y soya, incluso a profundidades de entre 20-30cm del sitio de inoculación (Kim *et al.*, 1997b).

Antibiosis. La producción de metabolitos con capacidad antibiótica, es otra de las capacidades que presenta *Bacillus* para inhibir a patógenos. Landa *et al.* (1997) al evaluar la capacidad de antagonismo de cepas de *Bacillus* aisladas de la rizosfera de garbanzo, mencionan que la producción de antibióticos y otros compuestos antifúngales están implicados en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* en bioensayos duales; esto se basa en el hecho de que en el bioensayo no se presentó un contacto directo entre el micelio del hongo y la colonia de la bacteria, y los compuestos responsables de la inhibición se difundieron a través del medio de crecimiento; de igual manera, se descarta una competencia por nutrientes ya que el medio de crecimiento los contiene. Otros resultados importantes de la actividad antagonista de los aislamientos de *Bacillus* fue la efectividad contra diferentes aislamientos de *Fusarium* así como diferentes razas tales como *Fusarium oxysporum* f.o. *ciceris*, *Fusarium oxysporum* f.o. *phaseoli* y *Fusarium oxysporum* f.o. *melonis*.

Inducción de resistencia y crecimiento de la planta. Un incremento en la resistencia dado por un factor externo que no altera el genoma de la planta es conocido como inducción de resistencia. Esta puede ser activada por inóculos no patógenos, patógenos, simbiontes, saprófitos o por la aplicación de inductores como el ácido salicílico o metabolitos microbianos (Kilian *et al.*, 2000).

La resistencia inducida por la activación de genes defensivos de las plantas y una estimulación del crecimiento de la planta y la raíz son otros de los mecanismos empleados por *Bacillus* (Kilian *et al.*, 2000). *Bacillus subtilis* no sólo inhibe patógenos, sino que promueve el crecimiento de la planta y de la raíz, e incrementa el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol como se reporta en hojas de tomate. Plantas de frijol tratadas con *Bacillus* incrementaron la cantidad de fenil amonio liasa y la actividad de peroxidasa (Lagunas *et al.*, 2001). En muchos casos la inducción de resistencia es acompañada por la producción de proteínas relacionadas con la patogenicidad. Algunas

de estas son glucanasas y quitinasas que tienen la capacidad de hidrolizar la pared celular de hongos (Agrios, 2001).

Algunas cepas de *Bacillus* pueden aumentar la protección sistémica contra patógenos foliares y pueden reducir la incidencia o severidad de enfermedades virales según estudios realizados en invernadero (Kloepper *et al.*, 2004). Un aumento en la formación de raíz de plantas infectadas ha sido descrito como un mecanismo de escape a la enfermedad. Un incremento en el crecimiento de la raíz permite a la planta crecer fuera de la región contaminada del suelo o sustrato, al igual para remplazar más fácilmente las secciones de raíz infectadas, al mismo tiempo permite a la planta alcanzar más temprano la etapa de menor susceptibilidad a las enfermedades (Kilian *et al.*, 2000).

***Bacillus* en el Control Biológico de Fitopatógenos**

La integración de *Bacillus*, como un agente de control biológico, ha demostrado ser un éxito en el manejo contra varias enfermedades (Jacobsen *et al.*, 2004). Landa *et al.* (1997) evaluaron la actividad como antagonistas de *Bacillus spp.* y *Streptomyces* aislados de la rizosfera de garbanzo, tres aislamientos de *Bacillus* fueron seleccionados por su fuerte actividad como antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 0, 1 y 5, y razas 0, 1 y 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. *Bacillus subtilis* aislamiento GB03 inhibió el crecimiento *in vitro* de una cepa altamente virulenta de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; además, en evaluaciones en invernadero *B. subtilis* colonizó efectivamente las raíces de garbanzo, así mismo, redujo el periodo de incubación de 4 a 5 días y el índice final de la enfermedad en un 32.5% (Hervas *et al.*, 1998).

Landa *et al.* (2004a) mencionan que el tratamiento del suelo y de la semilla de garbanzo con *Bacillus megaterium* y *Paenibacillus macerans* pueden suprimir la marchitez por *Fusarium*, pero la supresión de la enfermedad por estas rizobacterias está influenciado por la temperatura del suelo. La máxima inhibición del crecimiento

micelial y germinación de conidias de *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* raza 5 *in vitro* ocurrió a una temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias y la producción de metabolitos inhibitorios. Landa *et al* (2004b) evaluaron un sistema de control de la marchitez por *Fusarium*, incluyendo la fecha de siembra, el uso de variedades resistentes y el control biológico con *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* y *Fusarium* no patogénico, encontraron que los antagonistas retrasaron el inicio de la enfermedad e incrementaron la emergencia de semillas.

Las mezclas de dos cepas de *Bacillus* demostraron ser superiores al aumentar la protección en múltiples plantas contra patógenos (Kloepper *et al.*, 2004). Hervás *et al.* (1997) al tratar semillas de garbanzo con *Fusarium* no patogénico encontraron un incremento de 11 a 25 días en el período de incubación de la enfermedad y una reducción en la incidencia final de la enfermedad. Además, al hacer una aplicación mixta de *Bacillus* y *Fusarium* no patogénico, la protección conferida por *Fusarium* no patogénico no fue disminuida. Schmidt *et al.* (2004), al aplicar una combinación de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* sobre betabel, determinó que las poblaciones de ambos antagonistas no se vieron afectados por la combinación. Guetsky *et al.* (2001) al probar una combinación de una levadura (*Pichia guillemontii*) con la bacteria *Bacillus mycoides* encontraron que la mezcla de estos antagonistas suprimió a *Botrytis cinerea* efectivamente (30 a 90%) bajo diferentes condiciones de temperatura, humedad y tiempo.

Pseudomonas fluorescens

El uso de bacterias como agentes de control biológico de patógenos de plantas en el suelo como una alternativa o estrategia complementaria a los métodos químicos ha sido investigada por muchos años (Landa *et al.*, 2004). En la supresión de los patógenos del suelo por parte de las bacterias promotoras del crecimiento, diferentes mecanismos están involucrados, como lo son la antibiosis, competencia por hierro mediante la producción de sideróforos, competencia por carbono e inducción de resistencia a

enfermedades, este último es el mecanismo más ampliamente estudiado recientemente (Leeman *et al.*, 1996; Raaijmakers *et al.*, 1999).

La efectividad de muchos agentes de biocontrol en campo está dada por la complejidad y variabilidad de los factores físicos, químicos, microbiológicos y ambientales (Kim and Misaghi, 1996). Además, para llevar a cabo el control biológico de muchas enfermedades de las raíces, es necesario como parte de la estrategia del manejo de la enfermedad que el antagonista colonice las partes distantes del punto de inoculación de la raíz. Tal es el caso de las especies de *Pseudomonas*, las cuales son consideradas como uno de los mejores colonizadores de la raíz (Kim *et al.*, 1997). Por lo tanto, para lograr un control biológico eficiente y consistente se requiere un cuidadoso conocimiento de los factores ambientales que regulan el crecimiento y actividad de los antagonistas (Kim y Misaghi, 1996). Muchos factores abióticos del suelo como son: pH, temperatura, humedad, textura y constituyentes orgánicos e inorgánicos pueden influir en los mecanismos de control (Landa *et al.*, 2004).

Antibiosis. Existen numerosos reportes de la producción de metabolitos antifungales producidos por bacterias *in vitro* que pueden además tener actividad *in vivo* (Whipps, 2001). Las cepas de *Pseudomonas fluorescens* que producen el antibiótico de amplio espectro 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) son reconocidas como algunas de las rizobacterias más efectivas en el control de enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo (Landa *et al.*, 2003). Aparentemente la producción de antibióticos por parte de *Pseudomonas* puede estar compuesto por dos sistemas; un factor de reconocimiento de las condiciones ambientales y un factor de respuesta citoplasmática (Whipps, 2001).

Competencia por Hierro. Aunque la competencia por espacio y nutrimentos entre bacterias antagonistas y hongos patógenos de plantas es un mecanismo ampliamente conocido, en los últimos años la competencia por hierro ha resultado de gran interés. Bajo condiciones limitantes de hierro las bacterias producen un compuesto quelatante de hierro. Las bacterias secuestran la limitada cantidad de hierro disponible en la rizosfera haciéndolo no disponible para los hongos patógenos, por lo tanto se limita su

crecimiento (Whipps, 2001). El Fe (III) es un elemento esencial para muchos microorganismos, siendo un factor limitante para el crecimiento microbiano y su actividad como habitante del suelo, por lo que los sideróforos de *Pseudomonas fluorescens* (Pioverdina), producidos *in situ*, se considera que quelatan el Fe (III) a formas que no son disponibles para los patógenos (Sosa-Pérez *et al.*, 2004; Loper y Henkels, 1999).

La competencia por hierro de *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiada y la producción de sideróforos del tipo pyoverdino ha demostrado el control de especies de *Pythium* y *Fusarium*. La producción de otros dos tipos de sideróforos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* contribuye a la protección de las plantas de tomate del daño por *Pythium*. La dinámica de competencia por hierro es un proceso complejo, ya que algunos sideróforos sólo pueden ser usados por las bacterias que los producen, otros pueden ser usados por diferentes bacterias. Así mismo, los diferentes factores ambientales pueden influir en la cantidad de sideróforos producidos (Whipps, 2001).

Inducción de resistencia. En los últimos años se ha registrado un gran crecimiento en el área del control biológico en lo que concierne a la resistencia inducida. Algunos de los efectos de las rizobacterias inductoras de resistencia que se han observado son reforzamiento epidérmico con depósito de nuevos materiales debajo de los sitios de infección como son calosa, lignina y algunos fenoles, el incremento en los niveles de algunas enzimas, así como un aumento en la expresión de los genes relacionados con el estrés. En la inducción de resistencia especies de *Pseudomonas* han sido estudiadas en sistemas donde la bacteria y el patógeno se han mantenido espacialmente separados durante todo el experimento, donde se exhibió que no se presentaron otros mecanismos de acción (Whipps, 2001).

Promoción de crecimiento de las plantas. El concepto de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP) es un concepto establecido recientemente. Las RPCP pueden incrementar el crecimiento por diferentes vías como son: una asociación simbiótica fijadora de N₂, la solubilización de nutrimentos como fósforo, la regulación de

la producción de etileno en la raíz, la liberación de otras fitohormonas y la disminución del nivel de metales pesados en el medio (Whipps, 2001).

Independientemente del modo de acción de cualquier agente biocontrolador, un factor clave es que posean la capacidad de colonizar extensamente la zona de la raíz. La colonización puede involucrar solamente la superficie de la raíz, también se puede presentar una colonización del tipo endófito lo cual depende fuertemente del tipo de bacteria y de planta. El crecimiento de bacterias dentro de la raíz ha sido registrado en RPCP con *Pseudomonas fluorescens* cepa Sm3-RN en *Picea glauca* y la cepa 2-79RN₁₀ en trigo, la cepa 63-28 en chícharo la cual puede crecer tanto en la superficie como de manera intercelular, la cepa CHAO en tabaco al igual que WCS417r en tomate presenta crecimiento intra e intercelular sobre la superficie de la raíz (Whipps, 2001).

Estas RPCP con crecimiento inter e intracelular presentan ventajas ecológicas en la competencia por los nutrimentos así como mayor protección de los factores ambientales del suelo que inducen altos niveles de estrés (Whipps, 2001).

***Pseudomonas fluorescens* en el Control Biológico de Fitopatógenos**

Las especies del género *Pseudomonas* se caracterizan por su rápido crecimiento, facilidad de cultivarse y manipularse genéticamente en el laboratorio y capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos (Whipps, 2001). Schmidt *et al.* (2004) al evaluar la influencia de la temperatura en la capacidad biocontroladora de *Pseudomonas* reportan un 100 % de germinación de betabel en condiciones óptimas para el antagonista; además, el control de *Pythium* está influenciado por bajas temperaturas. Leeman *et al.* (1996) encontraron que *P. fluorescens* disminuye la marchitez por *Fusarium* en rábano, y esto fue dado por una inducción de resistencia sistémica ya que el antagonista y patógeno no entraron en contacto en el sistema de la raíz. De Boer *et al.* (2003) evaluaron dos cepas de *Pseudomonas* con diferentes mecanismos de control como son la producción de sideróforos y la inducción de resistencia sistémica para el control de *Fusarium* en rábano, encontrando que la

combinación de estas cepas logró suprimir la enfermedad hasta en un 50% comparado con el 30% alcanzado con las cepas aplicadas por separado.

Diferentes cepas de *Pseudomonas* productoras del antibiótico 2,4-DAPG no afectaron a *Glomus mosseae*, sino que contrariamente indujeron un aumento de la germinación de la espora en suelo, el desarrollo micelial y la colonización de *Glomus* en la raíz de tomate. Este efecto no fue atribuido a la producción de 2,4-DAPG ya que una de las cepas estudiadas presentaba deficiencia en la producción de este antibiótico sin embargo también indujo el efecto positivo sobre *Glomus* (Barea *et al.*, 1998). Frey-Klett *et al.* (1997) al evaluar el efecto de *Pseudomonas fluorescens* sobre *Laccaria bicolor* un hongo formador de ectomicorriza en abeto, encontraron que poblaciones de *Pseudomonas* desde 30 ufc/g de materia seca del suelo ayudaron en el establecimiento de la simbiosis planta-hongo y atribuyeron este efecto a las siguientes tres hipótesis; la bacteria facilita los mecanismos de reconocimiento entre los dos simbiosis; la bacteria ayuda en las etapas iniciales mejorando la formación de la ectomicorriza; y la bacteria estimula al hongo en su crecimiento micelial aumentando las posibilidades de contacto raíz-micelio.

Dos cepas de *P. fluorescens* y una de *P. putida* cada una combinada con *G. intraradices* para el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* incrementaron el peso fresco y contenido de fósforo en la planta, además, el peso seco fue aumentado hasta en un 107 % comparado con el control (Akkopru y Demir, 2005). El control de la marchitez por *Fusarium* en garbanzo en un sistema de cultivo sustentable puede ser manejado exitosamente mediante una estrategia que incluya como medidas de control la fecha de siembra, cultivares con resistencia genética y el uso de agentes de biocontrol como son *P. fluorescens* y *P. putida* (Landa *et al.*, 2004b)

Glomus intraradices

El término micorriza se refiere a la asociación simbiótica mutualista que se desarrolla entre la mayoría de las raíces de las plantas superiores y ciertos hongos que son

comunes en el suelo. En esta asociación el hongo infesta la corteza radical de manera endófito y proyecta sus hifas hacia dentro y fuera de la raíz, asumiendo funciones de asimilación y transporte de agua y nutrientes (Roman, 2003), con lo cual se promueve el crecimiento de la planta, se limitan los nutrientes disponibles para patógenos y se induce resistencia en la planta (Whipps, 2001; Arriola *et al.*, 1997).

Mientras que la inoculación con MA y su establecimiento puede ser más benéfica en sistemas productivos deficientes, las condiciones que limitan su establecimiento pueden ser la alta disponibilidad de fósforo y agua, así como las frecuentes aplicaciones de fungicidas (Niemira *et al.*, 1996).

El establecimiento del hongo en la raíz hospedera involucra una serie de eventos complejos y modificaciones intracelulares (Rakefet *et al.*, 1998). La colonización de las raíces se puede dar por medio de esporas, hifas extraradicales o por raíces previamente colonizadas. El micelio extraradical puede extenderse a lo largo de la raíz para formar nuevos puntos de entrada, pero usualmente el objetivo es formar un extensivo micelio extraradical. Desde el punto de inoculación de la MA, esta crece de manera intercelular e intracelular y forma ramas laterales de hifas llamados arbusculos, los cuales son estructuras que rodean la membrana citoplasmática, produciéndose una extensa área de contacto hasta en 10 veces superior que permite incrementar el intercambio de nutrientes. Como siguiente etapa el hongo puede formar vesículas en las cuales almacena lípidos (Van Arlet y Axel Olsson, 2003).

Las MA al ser importantes miembros de la rizosfera y considerados como efectivos simbioses, pueden proteger a la planta de daño en la raíz por patógenos, por lo cual son utilizadas en el control de patógenos como *Fusarium* en tomate. Las MA pueden limitar las enfermedades fungosas y por nematodos en la raíz por medio de un reforzamiento en las características morfológicas de las plantas con algunas modificaciones fisiológicas y microbianas en la micorizosfera y con una alteración en la composición química de los tejidos de las plantas (Akkopru y Demir, 2005).

La presencia de MA en dos variedades de chile cultivadas bajo invernadero tuvo un efecto significativo en la concentración de ácido indol-3-acético, ácido giberélico y de 6-amino purina, lo cual indujo respuestas favorables en el número de hojas, área foliar, número y peso seco de frutos (Román, 2003).

Akkopru y Demir (2005), al estudiar el efecto del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* y cuatro rizobacterias, 2 biotipos de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* y *Enterobacter cloacae* para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mencionan que las combinaciones fueron más efectivas que las aplicaciones solas para la inhibición del patógeno. Además hacen mención de dos rizobacterias estimulan la colonización de la micorriza hasta en un 9.5% más que ésta sola, atribuyendo este efecto a un estímulo en la germinación de las esporas y en el desarrollo del micelio por parte de la bacteria. De igual manera, encontraron que estas combinaciones de microorganismos tuvieron un efecto positivo sobre la densidad de las poblaciones de las bacterias, estos cambios en las poblaciones los atribuyen a un aumento en la cantidad y calidad de los exudados de la raíz inducidos por la colonización de la micorriza.

***Trichoderma* spp.**

Las especies del género *Trichoderma* han sido conocidas por lo menos desde 1920, por su habilidad para actuar como agentes de control contra patógenos de plantas (Harman, 2005). *Trichoderma* spp., es un hongo que se encuentra interactuando fuertemente con raíces, suelo y follaje. En los últimos años se ha conocido que produce un amplio rango de antibióticos, que parasita a otros hongos, que puede competir con otros microorganismos por exudados de la semillas que son fundamentales para estimular la germinación de propágulos de hongos patógenos de plantas en el suelo y de manera más general que compite con otros microorganismos por nutrientes y espacio (Harman *et al.*, 2004). Hasta recientemente se había asumido que estos eran sus principales mecanismos de control sobre los patógenos; sin embargo, investigaciones recientes demostraron que el efecto de *Trichoderma* sobre las

plantas incluía además un sistema de inducción de resistencia y crecimiento (Howell, 2003).

Antibiosis. La producción de antibióticos por hongos que exhiben actividad de biocontrol ha sido más comúnmente reportada en aislamientos de *Trichoderma* (Whipps, 2001). Se reporta una lista de 43 sustancias producidas por *Trichoderma* que poseen actividad antibiótica, entre las cuales se encuentran: alkyl-pironas, isonitrilos, poli-cetidos, peptaibol, diceto-piperazinas, sesquiterpenos y esteroides que frecuentemente son asociadas con el biocontrol de patógenos por parte de diferentes especies y cepas de *Trichoderma*. Algún antibiótico puede ser importante en la actividad de una cepa, pero puede no ser producida por otra que presenta una alta efectividad de biocontrol; incluso, los antibióticos producidos por *Trichoderma* pueden ser específicos contra un solo patógeno (Whipps, 2001). Muchos de estos antibióticos son sinergistas con las enzimas que degradan la pared celular de los patógenos (Harman, 2000).

Inducción de resistencia y crecimiento. *Trichoderma* es un eficiente inductor de resistencia en plantas tanto a nivel sistémico como localizado (Howell, 2003). El grado de protección proporcionado por aislamientos de *Trichoderma* que inducen resistencia sistémica puede ser tan efectivo como el proporcionado por fungicidas (Hoitink *et al.*, 2005). El sistema de inducción de resistencia es complejo, siendo tres las rutas de inducción de resistencia reconocidas. Dos de estas rutas involucran la producción directa de proteínas relacionadas con la patogenicidad ya sea como resultado del ataque de microorganismos patógenos o como resultado de heridas o necrosis ocasionadas por insectos. El tercer tipo de inducción se da por microorganismos no patógenos que se encuentran asociados a la raíz (Harman *et al.*, 2004). *Trichoderma* ha demostrado la capacidad de solubilizar el fósforo y algunos micronutrientes para hacerlos disponibles para la planta y mejorar su crecimiento (Whipps, 2000).

Competencia por espacio y nutrimentos. La competencia por la rizosfera es importante por que un antagonista no puede competir por espacio y nutrimentos si no

presenta la capacidad de establecerse en ésta. *Trichoderma* aplicado tanto al suelo como a la semilla tiene la capacidad de establecerse en todo el sistema de la raíz rápidamente (Howell, 2003).

Micoparasitismo. Este ha sido ampliamente considerado como un importante mecanismo de control de *Trichoderma*. El proceso que envuelve al micoparasitismo es complejo y pueden consistir en varias fases; las cepas de *Trichoderma* detectan a otros hongos y crecen hacia estos, una señal remota es dada al menos parcialmente por la expresión de enzimas que degradan la pared celular (quitinasas), la difusión de estas enzimas catalizan la liberación de oligosacáridos del hongo objetivo, y estos al ser asimilados por *Trichoderma* inducen el metabolismo de una batería de enzimas (quitinasas, glucanasas y proteasas) con lo cual se inicia el ataque antes de que se presente el contacto directo. Una vez que se realiza el contacto, *Trichoderma* ataca al hospedero enrollándolo y formando apresorios sobre la superficie de éste. Así mismo, *Trichoderma* secreta las enzimas hidrolíticas con lo cual se lleva a cabo el parasitismo acompañado de la disolución de la pared celular. La pared celular está compuesta por polisacáridos como son quitina y glucanos responsables de la rigidez (Harman *et al.*, 2004). Aunque no todos estos eventos pueden ocurrir en la interacción hongo-hongo, el factor clave es la transferencia de nutrimentos del hospedero hacia el micoparásito (Whipps, 2001). Estudios sobre el micoparasitismo de *Trichoderma* sp., han demostrado que este hongo produce una mezcla rica de enzimas antifúngicas, incluyendo quitinasas, β -1,3 glucanasas, proteasas y celulasas (Harman, 2005).

Benhamou y Chet (1996), al estudiar el parasitismo de *Trichoderma harzianum* sobre esclerocios de *Sclerotium rolfsii* *in vitro*, revelaron que la hifa de *Trichoderma* creció abundantemente sobre los esclerocios y formó una densa capa de micelio. Además, la hifa del antagonista se multiplicó sobre el esclerocio y desarrolló la habilidad para penetrar la estructura. Este crecimiento del antagonista se mantuvo intracelular y la penetración de las paredes de la estructura fue por medio de presión mecánica de las hifas y por la lisis enzimática. *Trichoderma* creció y se desarrolló ampliamente, con alteraciones celulares como retracción del citoplasma y rompimiento de la vacuola.

Duffy *et al.* (1996), al probar una combinación de *Trichoderma koningii* con *Pseudomonas fluorescens* en campo para el control de *Gaeumannomyces graminis* causante de la enfermedad del mal de pie en trigo, encontraron que una combinación de estos antagonistas incrementaba los rendimientos comparado con *Pseudomonas fluorescens* sola, además en pruebas *in vitro*, combinaciones de *T. koningii* con 6 bacterias antagonistas proporcionaron mayor control de la enfermedad que las bacterias solas, todas las combinaciones de *T. koningii* con *Pseudomonas* fueron compatibles.

Una combinación de *Trichoderma* cepa T-22 con *G. intraradices* para el control de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en campo realizada por dos años consecutivos en Florida, resultó en una mayor consistencia en la supresión de la enfermedad que las aplicaciones de los antagonistas por separado; además, al evaluar la colonización de ambos antagonistas a los 42 días de la siembra se encontró un 50 y 100% de colonización de *Glomus* y *Trichoderma* respectivamente (Datnoff *et al.*, 1995). El patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 fue suprimido *in vitro* de manera efectiva por la cepa T-22 de *T. harzianum*, la colonia del patógeno fue cubierta totalmente y el antagonista esporuló profusamente sobre el patógeno. En evaluaciones en invernadero, la colonización de *Trichoderma* se incrementó hasta diez veces de las poblaciones con que inicialmente se trató la semilla, mientras que en el antagonista se retrasó el periodo de incubación y se redujo el índice final de la enfermedad (Hervas *et al.*, 1998).

Quitinasas

Las quitinasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y tienen un papel importante en la degradación de quitina, un polisacárido estructural presente en diferentes organismos, principalmente artrópodos y hongos (De La Cruz *et al.*, 1992). La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de acetilglucosamina que están

unidas entre sí por enlaces β -1-4. La mayoría de los hongos patógenos en su pared celular contienen quitina y β -1-3 glucanos.

En la composición bioquímica de la hifa y el esclerocio de *Sclerotium rolfsii* se reportan diferencias tanto en calidad como en cantidad de polisacáridos. La pared de la hifa contiene una cantidad significativamente superior de polisacáridos que la pared del esclerocio; tanto la hifa como el esclerocio presentan un contenido bajo en hexosaminas con 3.5 y 1.6%, respectivamente (Chet *et al.*, 1966). La composición bioquímica de la pared celular de diferentes formas especiales de *Fusarium oxysporum* varió en el contenido de acetilglucosamina entre 8 y 11% (Schoffemeer *et al.*, 1999). Hadar *et al.* (1978) mencionan que en la pared celular de *Rhizoctonia solani* está presente solamente entre un 6-8% de quitina.

La disolución o daño de estos polímeros estructurales tiene un efecto adverso en su desarrollo. La quitina en la pared celular del hongo se encuentra como una capa microfibrilar primaria o como un complejo interior de capas con glucanos y proteínas (Benhamou and Chet, 1996). En los hongos, las quitinasas son importantes en la diferenciación y división celular, al igual que en la nutrición en algunas especies de hongos que desarrollan actividad de micoparasitismo, algunas de ellas del género *Trichoderma* (De la Cruz *et al.*, 1992).

Como se ha mencionado anteriormente, algunas especies del género *Trichoderma* han sido propuestas como agentes de control biológico contra hongos patógenos. La degradación y posterior asimilación de estos hongos, llamado micoparasitismo, ha sido propuesto como el mejor mecanismo desarrollado por este antagonista. Diferentes aislamientos de *Trichoderma* son capaces de secretar quitinasas, glucanasas y proteasas hacia el medio cuando crecen en presencia de laminarina, quitina o paredes celulares de hongos patógenos (De La Cruz *et al.*, 1992). En el sistema de producción de quitinasas de *Trichoderma harzianum* cepa TM se encontraron seis distintas quitinasas: dos fueron identificadas como β -1-4-N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.30) que hidrolizan monómeros de quitina del tipo exo, llamadas CHIT 102 y CHIT 73, y

cuatro fueron caracterizadas como endoquitinasas (EC 3.2.1.14) que hidrolizan al azar en los sitios internos del polisacárido llamadas CHIT 52, CHIT 42, CHIT 33 y CHIT 31 (Haran *et al.*, 1996).

La expresión de varios tipos de quitinasas puede ser regulada de una manera muy específica por el tipo de huésped. Cuando *Trichoderma* parasita a *Sclerotium roffsii* una quitinasa de 102 kDa es la primera en ser inducida, 12 horas después del contacto esta proteína desaparece y una quitinasa de 73 kDa es expresada en altos niveles. Sin embargo, cuando *Trichoderma* parasita a *Rhizoctonia solani* el patrón de expresión de quitinasas es diferente, por lo que se asume que la expresión de estas enzimas es un proceso regulado y sincronizado específicamente por el tipo de hospedero que el antagonista micoparasite (Haran *et al.*, 1996).

En el proceso de degradación de paredes celulares de hongos patógenos por *Trichoderma* sp., se presenta una mayor actividad de quitinasa, además la producción de esta enzima es de gran significancia en el proceso de micoparasitismo (Haran *et al.*, 1996). La actividad lítica de varias cepas de *Trichoderma harzianum* sobre paredes celulares de hongos patógenos ha sido correlacionada con el grado de biocontrol de patógenos *in vivo* (De la Cruz *et al.*, 1992).

Glucanasas

Las β -1,3-glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces O-glucosídicos de las cadenas de β -glucanos por dos mecanismos. Exo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.58) que hidroliza un sustrato removiendo los residuos de glucosa de los extremos no reductores y endo- β -1,3-glucanasa (EC 3.2.1.39) rompe al azar enlaces β -1,3 glucosídicos dentro de la cadena polimérica, liberando oligosacáridos. La degradación de β -glucanos por hongos es frecuentemente acompañada por la acción sinérgica de ambos tipos de enzimas endo y exo. Se ha sugerido que las β -glucanasas tienen una función

importante en la asimilación de nutrientes en hongos saprófitos y micoparásitos, y han sido implicadas en procesos de autólisis (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998).

La degradación de las paredes celulares de hongos requiere enzimas que puedan hidrolizar polímeros de glucosa con varios enlaces glucosídicos. Las β -1,3-glucanasas son reconocidas como enzimas importantes ya que rompen la pared celular de los hongos atacando el componente estructural más común; los β -1,3-glucanos (Downer *et al.*, 2001). Schoffemeer *et al.* (1999) reportan el contenido de glucanos en la pared celular de diferentes formas especiales de *Fusarium oxysporum* entre un 63-66% del peso seco de la pared celular. La hifa de *Sclerotium rolfsii* presenta un 67.5 % de glucanos y un 39.5 % en el esclerocio (Chet *et al.*, 1966). Hadar *et al.* (1979) mencionan que la pared celular de *Rhizoctonia solani* está compuesta principalmente por glucanos.

Las β -1,3-glucanasas son comúnmente producidas por los hongos de una manera constitutiva, los patrones de inducción de la enzima pueden variar en respuesta a la estructura del glucano y del tipo de enlace (El-Katatny *et al.*, 2000). La producción de β -1,3-glucanasas por parte de *Trichoderma* spp. se incrementa significativamente cuando es cultivado en un medio suplementado con micelio estéril o con la pared celular de hongos hospederos. La actividad glucanasa de *Trichoderma* dependerá de la cantidad de glucanos presentes en la pared celular del hospedero, que bajo condiciones inducidas produce un complejo sistema de al menos siete glucanasas (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998).

BIBLIOGRAFIA

Agrios, G.N. 2001. Fitopatología. Ed. Limusa. Mexico. Pp. 109.

Akkopru, A. and Demir, S. 2005. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Phytopathology* 153:544-550.

Arriola, L., Niemira, B.A. and Safir G.R. 1997. Border cells and arbuscular micorrhizae in four amaranthaceae species. *Phytopathology* 87:1240-1242.

Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'Gara, F., and Azcon-Aguilar C. 1998. Impact on arbuscular micorriza of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2304-2307.

Benhamou, N., and Chet, I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86:405-416.

Chet, I., Henis, Y., and Mitchell, R. 1966. Chemical composition of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* sacc. *Canadian Journal Microbiology* 13:137-141.

Datnoff, L.E., Nemecek, S., and Pernezny, K. (1995). Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological control* 5:427-431.

De Boer, M., Bom, P., Kindt, F., Keurentjes, J., Sluis, I., Loon, and L., Bakker, P. 2003. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93:626-632.

De La Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A. and Llobell, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum* European Journal of Biochemistry 206:859-867.

Downer, A.J., Menge, J.A., and Pond E. 2001. Effects of cellulytic enzymes on *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 91:839-846.

Duffy, B., K., Simon, A., and Weller, D.M. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. Phytopathology. 86: 188-194.

El-Katatny, M.H., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katatny, M.S., and Gubitz, G.M. 2000. Production of chitinase and -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technology and Biotechnology 38:173-180.

Estañol-Botello, E., Ronald-Ferrera, C., Carlos-Sosa, M., Santizo-Rincón, J., y Quintero-Lizaola, R. 1998. Interacción del nematodo *Meloidogyne chitwoodi* con tres especies de hongo *Glomus spp.* en la producción y distribución de materia seca de plantas jóvenes de maíz. Terra 17:17-25.

Frey-Klett, P., Pierrot, J.C., and Garbaye, J. 1997. Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas fir. Applied and Environmental Microbiology 63:139-144.

García-Estrada, R., Carrillo-Fasio, J.A. y Márquez-Zequera, I. 2004. Distribución e identificación de los patógenos relacionados con la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa. Memoria Foro Regional de Garbanzo (Fundación Produce Sinaloa) 23-25 Pp.

- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., and Dinor, A., 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91:621-627.
- Hadar, Y., Chet, I., and Henis Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69:64-68.
- Haran S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86:980-985.
- Harman, G.E., Howell C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology* 2:43-56.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84:377-393.
- Harman, G.E. 2005. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Hervas, A., Landa, B., Datnoff, L.E., and Jiménez-Díaz, R.M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13:166-176.
- Hervás, A., Landa, B., and Jiménez-Díaz, R.M. 1997. Influence de chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* 103: 631-642.
- Hoitink, H.A.J., Madden, L.V., and Dorrance, A.E. 2005. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp: Interactions between the host, pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology* 96:186-189.

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

ICRISAT/ICARDA. 1990. Chickpea in the Nineties: Proceeding of the second international workshop on chickpea improvement. ICRISAT Center. Patancheru, India. 403 p. www.icrisat.org/soilbornediseasesofchickpea.com

INIFAP. 1998. El cultivo del garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto para productores. No. 41. 2da. Ed. México. Pp. 2-25.

Infoagro, 2005. El cultivo del garbanzo. Agroinformación del norte de Casilla. 3 p. <http://www.infoagro.com>

Jacobsen, B.J., Zidack, N.K. and Larson, B.J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology* 94:1272-1275.

Jiménez-Gasco, M., Navas-Cortés, J., and Jiménez-Díaz, R. 2004. The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. *International Microbiology*. 7:95-104.

Kaur, N.P., and Mukhopadhyay, A.N. 1992. Integrated control of chickpea wilt complex by *Trichoderma* and chemical methods in India. *Trop. Pest Manage* 38:372-375.

Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G., and Hain, R. 2000. *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 1:72-93.

Kim, D.H. and Misaghi, I.J. 1996. Biocontrol performance of two isolates of *Pseudomonas fluorescens* in modified soil atmospheres. *Phytopathology* 86:1238-1241.

Kim, D.S., Cook, R.J., and Weller, D.M. 1997a. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87:551-558.

Kim, D.S., Weller, D.M., and Cook, R.J. 1997b. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R₁₂ and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN₁₀ in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 87:559-564.

Kloepper, J.W., Ryu, C.M., and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

Ladizinsky, G. 1975. A new *Cicer* from Turkey. *Notes from the Royal Botanical Garden Edinburg*. 34: 201-202.

Lagunas-Lagunas, J., Zavaleta-Mejia, E., Osada-Kawasoe, S., Aranda-Ocampo, S., Luna-Romero, I. y Vaquera-Huerta, H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biologico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista mexicana de Fitopatología* 19:57-65.

Landa, B.B., Hervás, A., Bettiol, W., and Jiménez-Díaz, R. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Phytoparasitica*. 25(5):305-318.

Landa, B.B., Jiménez-Díaz, R.M., y Navas-Cortés, J.A. 2002. Uso de agentes de biocontrol para la implementación de una estrategia de control integrado de la fusariosis vascular del garbanzo. *Phytoma* 144:99-102.

Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., and Jiménez-Díaz, R.M. 2004a. Influence of temperature on plant-rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *Fusarium* wilt of chickpea. *Plant Pathology*. 53: 341-352.

Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., and Jiménez-Díaz, R.M. 2004b. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology*. 94: 946-960.

Landa, B.B., Mavrodí, D.M., Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 2003. Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 93:982-994.

Leeman, M., Den Ouden, F.M., Van Pelt, J.A., Dirkx, F.P.M., Stejil, H., Bakker, P.A.H.M. and Schippers, B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86:149-155.

Lo, C.T., Nelson, E.B., and Harman, G.E. 1997. Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. *Plant Disease* 81: 1132-1138.

Loper, J.E., and Henkels M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5357-5363.

Lorito, M., Woo, S.L., Dambrosio, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P., and Scala, F. 1995. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Phytopathology* 9:206-213.

Niemira, B.A., Hammerschmidt, R., and Safir, G.R. 1996. Postharvest suppression of potato dry rot (*Fusarium sambucinum*) in pre-nuclear minitubers by arbuscular mycorrhizal fungal inoculum. *American Potato Journal* 78:509-515.

Raaijmakers, J.M., Bonsall, R.F., and Weller, D.M. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 89:470-475.

Rakefet, D., Itzhaki H., Ginzberg I., Gafni, Y., Galili, G., and kapulnik, Y. 1998. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytopathology* 11:489-497.

Roman, G.F. 2003. Concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrizicos en dos cultivares de chile (*Capicum annum* L.) Tesis de Doctorado. Universidad de colima. Tecoman, Colima, México. pp. 83-84.

Ruiz Altisent, M. 1989. El garbanzo una alternativa para el secano. Ed. Mundi prensa. Madrid España. Pp. 12-92.

SAGARPA, 2004. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.siea.sagarpa.gob.mx

Schmidt, C.S., Agostini, F., Leifert, C., Killham, K., and Mullins, C.E., 2004. Influence of soil temperature and matric potential on sugar beet seedling colonization and suppression of *Phythium* damping-off by the antagonistic bacteria *pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 94:351-363.

Schoffemeer, E.A.M., Klis F.M., Sietsma, J.H., and Cornelissen B.J.C. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 27:275-282.

Sosa-Pérez, R., Váldez R. M., y Velásquez, D. M. 2004. Producción de sideròforos por cepas de *Pseudomonas*. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa. Pag. 270 – 274.

Van Aarlet I.M. and Axel, O.P. 2003. Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6762-6767.

Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C.A., and Herrera-Estrella, A. 1998. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 64:1442-1446.

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-511.

Vavilov, N. I. 1926. Studies of the origin of plants. Leningrand. Pp 129-238.

Van Der Maesen, L. J. G. 1972. Cicer L. a monograph of the genus, with special reference to the Chickpea (*Cicer arietinum* L.) its ecology and cultivation. Mededelingen and bouwhogeschool (Communications Agricultural University) Wageningen 72-10. Pp 342

CAPITULO 1

Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo en el Estado de Sinaloa

RESUMEN

Se determinó la actividad antagonista *in vitro* de 35 aislamientos obtenidos de la rizosfera de garbanzo contra el complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo: *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. Las cepas nativas que mostraron el mayor porcentaje de inhibición micelial de los patógenos fueron identificadas como *T. lignorum* (CIAD 06-540903), *T. harzianum* (CIAD 05-550903), *B. subtilis* (CIAD-940111) y *P. fluorescens* (CIAD-990111). Para la evaluación en campo, las cuatro cepas nativas y una cepa comercial de *Trichoderma* (T-22) fueron combinadas con *G. intraradices* y su efectividad se comparó contra un tratamiento químico (PCNB) y un testigo absoluto. Los tratamientos se aplicaron a la semilla previo a la siembra y se evaluó la severidad de la enfermedad cada 15 días y el índice de colonización a los 45 días. La colonización de *T. harzianum* CIAD 05-550903-*G. intraradices* fue de 3.3×10^3 ufc/g de raíz fresca-75%, *B. subtilis*-*G. intraradices* fue de 1.3×10^8 ufc/g de raíz fresca-75%, mientras que en la combinación *P. fluorescens*-*G. intraradices* fue de 1.4×10^7 ufc/g de raíz fresca-88%, respectivamente; mismas que presentaron una mayor reducción de la severidad de la enfermedad en 64, 57 y 51%, respectivamente en comparación con el testigo.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, micorriza, control biológico.

ABSTRACT

In vitro antagonist activity against chickpea wilt caused by the complex: *F. oxysporum*, *S. rolfsii* and *R. solani*, was determined in 35 isolates obtained from chickpea-rhizosphere. The native strains with major percentage of pathogen mycelia inhibition were identified as *T. lignorum* (CIAD 06-540903), *T. harzianum* (CIAD 05-550903), *B.*

subtilis (CIAD-940111) and *P. fluorescens* (CIAD-990111). For field evaluation, the four native strains and a commercial strain of *Trichoderma* (T-22), were combined with *G. intraradices* and their effectiveness was compared against a chemical treatment (PCNB) and an absolute control. Previously to seeding seeds were applied with treatments and evaluations of disease severity were done each 15 days, while colonization index was evaluated after 45 days. Colonization of *T. harzianum* CIAD 05-550903-*G. intraradices* was 3.3×10^3 ufc/g fresh root-75%, *B. subtilis*-*G. intraradices* was 1.3×10^8 ufc/g fresh root-75%, while the combination *P. fluorescens*-*G. intraradices* was 1.4×10^7 ufc/g fresh root-88%, respectively; in addition to, they showed a major reduction of disease severity in 64,57 y 51%, respectively in contrast with the control.

Key words: *Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, mycorrhizal, biological control.

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la segunda leguminosa de grano seco que se cultiva alrededor del mundo, sólo después de frijol (Hervas *et al.*, 1998). En México, el estado de Sinaloa es el mayor productor de este grano para consumo nacional y para exportación (INIFAP, 1998). Una de las principales limitantes para la producción de garbanzo en Sinaloa y otras regiones del mundo, es la enfermedad conocida como "marchitez" o "rabia" del garbanzo, la cual es ocasionada por el complejo de hongos: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Esta enfermedad causa pérdidas en el cultivo que oscilan del 10-50 % de la producción (García-Estrada *et al.*, 2004).

Algunas de las estrategias que han sido implementadas para el control de la enfermedad son la rotación de cultivos, el retiro de socas y el uso de semilla libre de patógenos y/o tratadas con fungicidas; sin embargo, los resultados han sido poco satisfactorios. El desarrollo de plantas con resistencia genética, ofrece la mejor estrategia práctica y económica para el manejo de la enfermedad (Hervas *et al.*, 1998); sin embargo, la presencia de nuevas razas de patógenos limita esta última estrategia

(Jiménez-Díaz *et al.*, 1993). Otra alternativa para el control de la enfermedad, es el control biológico utilizando microorganismos antagonistas como bacterias y hongos.

Diversas investigaciones han demostrado que el control biológico a través del uso de hongos y bacterias benéficas es una alternativa potencial al uso de fungicidas y/o fumigantes. Por ejemplo, Kaur y Muthamilan (1992) demostraron que el complejo de hongos causantes de la marchitez del garbanzo, incluyendo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, fue controlado efectivamente por *Trichoderma harzianum* Rifai. En otro estudio, la aplicación de la cepa RBT13 de *Pseudomonas fluorescens* a la semilla de garbanzo, suprimió en un 52 % la marchitez por *Fusarium* y adicionalmente incrementó la germinación, el crecimiento y el rendimiento del cultivo (Kumar y Dube, 1992). Diversas especies de *Bacillus*, aisladas de la rizosfera de garbanzo, han demostrado capacidad para inhibir la germinación y el crecimiento de hifas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y suprimir el desarrollo de la marchitez del garbanzo (Landa *et al.*, 1997); así mismo, las micorrizas ocasionan un incremento en la actividad de la rizosfera en favor de otros microorganismos que compiten con los fitopatógenos del suelo (Meyer y Linderman, 1986).

En la selección de antagonistas para el control de la rabia del garbanzo se ha enfatizado el uso de agentes individuales; sin embargo, parece factible que incrementando el número de agentes de biocontrol con el uso combinado de diferentes especies puede resultar en tratamientos de alta persistencia en la rizosfera, con mecanismos de control diferentes y con mayor resistencia a las condiciones ambientales. Akkopru y Demir (2005) demostraron que la combinación de rizobacterias y *Glomus intraradices* es efectiva para controlar la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; además, la combinación también incrementó la colonización, el peso seco y el contenido de fósforo en la planta. Barea *et al.* (1998) reportaron que cepas de *Pseudomonas* productoras del antibiótico diacetilfloroglucinol incrementan la germinación y biomasa de *Glomus*, así como su colonización en raíces de tomate. La mezcla de hongos antagonistas como *T. harzianum* y micorrizas arbusculo-vesiculares (MAV) del hongo *Glomus intraradices* Schenk y Smith, han demostrado que solos o en

mezclas han sido efectivos en el control biológico de fitopatógenos de la raíz en hortalizas (Datnoff *et al.*, 1995). Estas investigaciones sugieren que las micorrizas y otros agentes de biocontrol son compatibles y pueden usarse en combinación, lo cual induce mayor control que los agentes utilizados en forma individual (Linderman, 1988).

Los objetivos del presente trabajo fueron, a) aislar y seleccionar de la rizosfera de garbanzo cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma*, con actividad antagonista contra los patógenos causantes de la rabia del garbanzo, y b) evaluar las mejores cepas de antagonistas en combinación con el hongo formador de micorrizas *Glomus intraradices* para suprimir la rabia del garbanzo en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de Antagonistas y Patógenos

La primera etapa del experimento inició con un recorrido por la zona productora de garbanzo del estado de Sinaloa. Se colectaron raíces de garbanzo tanto de plantas sanas como de plantas que presentaban síntomas leves de la enfermedad, que estaban localizadas dentro de los manchones característicos de la "rabia" del garbanzo.

Los patógenos se aislaron de las raíces de garbanzo con la metodología propuesta por Booth (1977), las raíces se lavaron con agua corriente y desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2%, se lavaron repetidamente con agua destilada estéril y se secaron en un flujo de aire laminar estéril, posteriormente pequeños trozos de tejido radicular se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a 25°C por siete días, y para su identificación se utilizaron diferentes claves taxonómicas (Booth, 1977; Barnett y Hunter, 1998; Sneb *et al.*, 1991). El aislamiento de los antagonistas se realizó de acuerdo a la metodología de Alexander (1994), inicialmente a las raíces se les retiró cuidadosamente el exceso de tierra, después se cortaron en segmentos de 1cm, se tomaron 50g de raíces y se agregaron a 450ml de agua destilada estéril, posteriormente se agitaron por 10 minutos y finalmente , se realizaron

diluciones seriadas y alícuotas de estas diluciones se sembraron en medio B de King para *Pseudomonas*, PDA acidificado para *Trichoderma* y PDA para *Bacillus*.

Selección e Identificación de Antagonistas

Se aislaron un total de 35 cepas (hongos y bacterias) de diferentes especies y se realizaron cultivos duales sobre PDA para seleccionar los antagonistas con habilidad de inhibir *in vitro* el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Para la evaluación de los antagonistas se utilizó la metodología de Bell *et al.* (1982), está consistió en colocar en dos extremos de una caja petri con PDA al antagonista a evaluar, *Bacillus* y *Pseudomonas* se colocaron haciendo un rayado con un asa bacteriológica y *Trichoderma* con discos de medio de cultivo con crecimiento activo de micelio y en el centro un disco de medio de cultivo con el patógeno a evaluar, como testigos se colocaron los patógenos sin los antagonistas en las cajas petri. Las cajas se incubaron a 25°C, el experimento se detuvo cuando el testigo llenó la caja y entonces se determinó el porcentaje de inhibición. Se realizaron cinco réplicas en un diseño aleatorizado completo. Se seleccionaron cuatro de las cepas de antagonistas que mostraron mayores índices de inhibición micelial de los patógenos para la identificación de especie y evaluación de efectividad en campo; inicialmente los antagonistas se identificaron en género, siendo éstas, dos cepas del género *Trichoderma* etiquetadas como CIAD 06-540903 y CIAD 05-550903, una del género *Bacillus* marcada como CIAD-940111 y una del género *Pseudomonas* etiquetada como CIAD-990111.

Para la identificación de las especies de *Trichoderma* se utilizaron las claves de Domsch *et al.*, (1980), para *Bacillus* se utilizó API 20 CH-*Bacillus* y para *Pseudomonas* pruebas morfológicas, fisiológicas, y bioquímicas de levana, prueba de oxidasa, pudrición de papa, hidróxido de arginina e hipersensibilidad de tabaco (Schaad, 1980). Las cepas de *Trichoderma* y *Bacillus* se enviaron al instituto de biotecnología de la UNAM, para su incremento en biomasa. *Bacillus* se fermentó en medio mineral con dextrosa como fuente de carbono, se utilizó un biorreactor de 43L de volumen nominal y

las condiciones fueron las siguientes; volumen de cultivo de 30L, aireación de 30L/min., 30°C, 235 rpm y 24 horas de cultivo (Rodríguez, 2005). Para la producción de inóculo de *Trichoderma* se utilizó un medio mineral y con condiciones similares a las de *Bacillus*, modificando solamente el tiempo a 5 días y las rpm a 180 (Serrano-Carreón *et al.*, 2002). La cepa de *Pseudomonas* se incrementó en medio líquido papa-dextrosa, en un agitador rotatorio a 120 rpm a 25°C durante 48 horas (Landa *et al.*, 1997) en el CIAD unidad Culiacán.

Evaluación en Campo de los Antagonistas Seleccionados

Los antagonistas seleccionados se utilizaron en la evaluación en campo para el control de los patógenos causantes de la rabia del garbanzo y se compararon contra una cepa comercial de *Trichoderma* (T-22), un producto de control químico (PCNB) y un testigo no tratado. Cada uno de los agentes de control biológico fue mezclado con *Glomus intraradices* (PHC-VAM-PWI[®]). El experimento en campo se realizó en un lote de textura arcillosa con antecedentes de daño severo de la rabia del garbanzo, ubicado en el campo Las Tatemitas Km. 91.5 de la carretera a Angostura. Se utilizó semilla de garbanzo de la variedad Blanco Sinaloa. La siembra se realizó el 5 de diciembre en el ciclo agrícola 2005-06, las prácticas agronómicas se siguieron según las indicaciones de INIFAP (1998).

La inoculación de la semilla consistió en asperjar 500 ml de buffer de fosfatos con la dosis de producto equivalente a la cantidad de semilla para cada tratamiento y a la concentración indicada (Cuadro 1) la cual se determinó por el método de cuenta viable en placa, más 1 g/L de goma xantana (Keltrol CG-RD, Kelco Industrial Biopolymers) como adherente. El tratamiento testigo consistió en asperjar solamente buffer de fosfatos + goma de xantana. La siembra se realizó con una sembradora de precisión.

Cuadro 1. Dosis de la combinación de antagonista mas *G. intraradices* utilizada para el tratamiento de semilla de garbanzo (100kg).

TRATAMIENTO	Dosis
1. <i>T. Ignorum</i> CIAD 06-540903 + <i>G. intraradices</i>	20g (1×10^7 ufc/g) + 25g (5.5×10^3 ufc/g)
2. <i>Trichoderma</i> T-22 + <i>G. intraradices</i>	20g (1×10^7 ufc/g) + 25g (5.5×10^3 ufc/g)
3. <i>T. harzianum</i> CIAD 05-550903 + <i>G. intraradices</i>	20g (1×10^7 ufc/g) + 25g (5.5×10^3 ufc/g)
4. <i>B. Subtilis</i> CIAD-940111 + <i>G. intraradices</i>	20g (2.9×10^{10} ufc/g) + 25g (5.5×10^3 ufc/g)
5. <i>P. fluorescens</i> CIAD-990111+ <i>G. intraradices</i>	20ml (3×10^9 ufc/ml) + 25g (5.5×10^3 ufc/g)
6. Quimico (PCNB)	1 litro
7. Testigo absoluto	-

Colonización de las Raíces por los Agentes de Control Biológico.

En cada réplica y para cada tipo de antagonista se determinó la colonización en la raíz. Esta variable se determinó en 4 plantas seleccionadas al azar por cada unidad experimental a los 45 días después de la siembra. Para llevar a cabo el aislamiento y conteo de los antagonistas en la rizosfera se utilizó la metodología descrita anteriormente (Alexander, 1994). Las raíces que se utilizaron para determinar la colonización de los antagonistas fueron usadas también para determinar la colonización por *G. intraradices*; para ello se realizó el aclareo y tinción de raíces con azul tripano en lactofenol y posteriormente se cuantificó el porcentaje de colonización por el método lineal de intersección (Phillips y Hayman, 1970).

Determinación de Severidad de la Enfermedad

Las evaluaciones se realizaron cada 15 días desde la siembra hasta la etapa fenológica de formación y llenado de bolsa en garbanzo, tomando en consideración los cuatro surcos centrales, para lo cual se contó con 100 plantas para cada surco (10cm de distancia entre planta y planta). En cada evaluación se registró el número de plantas infectadas considerando la sintomatología ocasionada por la enfermedad y utilizando la siguiente escala subjetiva: 0= Planta sana; 1= Planta clorótica; 2= Planta marchita y 3= Planta muerta (Carrillo, 2004). Los datos sobre la severidad de la enfermedad fueron usados para calcular el índice de severidad de la enfermedad (P) determinado como $P = (\sum S_i \times N_i) / (3 \times N_t)$ donde; P es la severidad del síntoma, N_i es el número de plantas con S_i severidad del síntoma y N_t es el número total de plantas por unidad experimental (Landa *et al.*, 2004).

Análisis Estadísticos

Para el experimento de campo se utilizó un diseño de bloques completos al azar (siete tratamientos y cuatro replicas por tratamiento), con un total de 28 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió en 16 surcos de 10m de longitud y 0.8m de distancia entre surco y surco, dando un total de 128m² para cada unidad experimental. Las variables a evaluar fueron la colonización de antagonistas en la raíz y el porcentaje de severidad de la enfermedad. Tanto para las pruebas de laboratorio y campo, las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con un 5 % de probabilidad de error. Se utilizó el paquete estadístico Minitab 14.

RESULTADOS

Aislamiento e Identificación de Microorganismos Antagonistas

Se presentaron diferencias estadísticas entre las cepas de antagonistas en los porcentajes de inhibición micelial de los patógenos causantes de la rabia del garbanzo (Cuadro 2). Las cuatro cepas antagonistas con mayores índices de inhibición fueron seleccionadas para el experimento en campo, y éstas fueron identificadas como *Trichoderma lignorum* (CIAD 06-540903), *Trichoderma harzianum* (CIAD 05-550903), *Bacillus subtilis* (CIAD- 940111) y *Pseudomonas fluorescens* (CIAD- 990111). Los porcentajes de inhibición fueron entre un 27.3 y 76.8%, *F. oxysporum* fue el patógeno menos inhibido en el crecimiento micelial por cada uno de los antagonistas y fueron entre 27.3 y 66.7%. La cepa de *T. lignorum* CIAD 06-540903 mostró el mayor porcentaje de inhibición micelial en todos los patógenos causantes de la rabia del garbanzo.

Cuadro 2. Inhibición del desarrollo micelial de los patógenos expresado en porcentaje.

Antagonista	Inhibición	Inhibición	Inhibición
	<i>Rhizoctonia</i> sp. %	<i>Fusarium</i> sp. %	<i>Sclerotium</i> sp. %
<i>Trichoderma lignorum</i>	74.6 ^a	66.7 ^a	76.8 ^a
<i>Trichoderma harzianum</i>	70.8 ^b	65.9 ^a	67.5 ^b
<i>Bacillus subtilis</i>	69.0 ^b	27.3 ^c	75.4 ^a
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	58.7 ^c	44.1 ^b	56.9 ^c
Testigo	0 ^d	0 ^d	0 ^d

Valores con la misma letra no difieren significativamente (P=0.05) con la prueba de Tukey

Colonización de la Rizosfera por los Agentes de Control Biológico

Todos los microorganismos antagonistas nativos presentaron la capacidad de colonizar las raíces de garbanzo, al igual que la cepa comercial de *T. harzianum* (T-22). En el caso de la colonización por *G. intraradices*, ésta osciló entre 14 y 88%. La combinación

de rizobacterias y *G. intraradices* resultó en una alta colonización de parte de ambos antagonistas, al igual que con la cepa de *T. harzianum* CIAD 05-550903; en contraste, la cepa de *T. lignorum* CIAD 06-540903 y la cepa comercial de *T. harzianum* (T-22) presentaron el menor índice de colonización, así como también el menor porcentaje de colonización por *G. intraradices* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Colonización de los antagonistas en la raíz de garbanzo.

Antagonista	ufc/g de raíz	Porcentaje de colonización por <i>Glomus</i>
<i>Trichoderma lignorum</i>	1.4×10^3	14.7
<i>Trichoderma</i> (T-22)	1.8×10^3	21.55
<i>Trichoderma harzianum</i>	3.3×10^3	74.8
<i>Bacillus subtilis</i>	1.3×10^6	75.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1.4×10^7	88.3

Supresión de la Enfermedad por los Antagonistas en Campo

En las tres evaluaciones de severidad, sólo el tratamiento testigo presentó estadísticamente la mayor severidad de la enfermedad (Cuadro 4). El tratamiento químico resultó con el menor nivel de severidad de la enfermedad en las primeras dos evaluaciones. En la última evaluación se presentaron resultados uniformes, ya que el tratamiento químico que inicialmente estaba protegiendo adecuadamente la raíz, terminó con un similar porcentaje de severidad que los tratamientos de antagonistas. La menor severidad de la enfermedad la registraron los tratamientos *T. harzianum* CIAD 05-550903-*G. intraradices*, *B. subtilis*-*G. intraradices* y *P. fluorescens*-*G. intraradices*. Los tratamientos de las cepas nativas de *Trichoderma* con *G. intraradices* y la cepa comercial de *T. harzianum* con *G. intraradices* presentaron diferentes niveles de supresión de la enfermedad entre ellos.

Cuadro 4. Severidad de la enfermedad en las tres evaluaciones expresado en porcentaje. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales $P \geq (0.05)$.

Tratamientos	Primera evaluación	Segunda evaluación	Tercera evaluación
<i>T. lignorum</i> + <i>Glomus</i>	0.68a	4.77a	7.20a
T-22 + <i>Glomus</i>	0.54a	6.06a	7.57a
<i>T. harzianum</i> + <i>Glomus</i>	0.49a	3.62a	4.99a
<i>Bacillus</i> + <i>Glomus</i>	0.74a	4.20a	6.08a
<i>Pseudomonas</i> + <i>Glomus</i>	0.52a	5.20a	6.86a
Químico (PCNB)	0a	2.91a	5.16a
Testigo	3.6b	12.22b	14.08b

DISCUSIÓN

El primer objetivo del presente trabajo fue aislar y seleccionar cepas de *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas* de la rizosfera de garbanzo, esto con el fundamento de que el ambiente de la rizosfera proporciona una oportunidad para seleccionar cepas efectivas como agentes de control biológico del ambiente en el que éstos pueden ser usados. Las 35 cepas de antagonistas presentaron diferente nivel de inhibición (datos no mostrados). En nuestro trabajo todos los antagonistas fueron aislados de plantas de garbanzo que presentaban signos leves de la enfermedad dentro de los manchones característicos de ésta. Las cepas de *Trichoderma* fueron las más efectivas, *T. harzianum* es la especie de este género más ampliamente reconocida como agente de control biológico de patógenos del suelo; sin embargo, dentro de las cepas aisladas *T. lignorum* presentó el mayor porcentaje de inhibición. Se observó un efecto de hiperparasitismo en las cepas de *Trichoderma* contra los fitopatógenos, ya que *Trichoderma* cubrió parcial o totalmente el crecimiento micelial de los microorganismos fitopatógenos y posteriormente se observaron alteraciones morfológicas en el micelio y conidias. En cambio, con las bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, el efecto fue vía antibiosis, ya que se observó la formación de un halo de inhibición del crecimiento con diferente intensidad en la zona de contacto con los microorganismos fitopatógenos.

De los tratamientos a partir de *Trichoderma* spp.-*G. intraradices* dos de ellos presentaron bajos niveles de formación de micorriza, esto debido tal vez a una incompatibilidad entre la cepa comercial *T. harzianum* (T-22) y la cepa nativa *T. lignorum* CIAD 06-540903 con *G. intraradices*. Una característica observada frecuentemente con micoparásitos es que no siempre están consignados para controlar patógenos; un micoparásito puede tener el potencial de atacar hongos formadores de micorrizas (Whipps, 2000). Rousseau *et al.* (1996), reportaron que *Glomus intraradices* es altamente susceptible al ataque de *T. harzianum*; sin embargo, señalan que sus resultados son difíciles de generalizar ya que esto dependerá de la agresividad de la cepa de *Trichoderma*, tal como lo observado en la cepa nativa *T. harzianum* CIAD 05-550903 la cual presentó menor inhibición micelial *in vitro* y cuando se combinó con *G. intraradices*, este último microorganismo colonizó ampliamente la raíz de garbanzo. Datnoff *et al.* (1995), evaluaron una combinación de la cepa *T. harzianum* (T-22) y *G. intraradices* (PHC-VAM-PWI[®]) para el control de *Fusarium* f. sp. *radicis-lycopersici* en Florida, y a los 42 días de la siembra, la colonización por *Glomus* fue de 50%. Estos resultados reflejan la complejidad de las interacciones que pueden ocurrir en la rizosfera de diferentes plantas, así como con diferentes sistemas experimentales. En nuestro experimento, las combinaciones de rizobacterias con *Glomus* resultaron en altas poblaciones de ambos antagonistas. Otros estudios han reportado que las rizobacterias estimulan la colonización de *Glomus* sp. ya que las rizobacterias favorecen la germinación de la espora y promueven el crecimiento del micelio; además, las altas poblaciones de rizobacterias están relacionadas con los cambios en los exudados de la raíz tanto en cantidad como en calidad inducidos por la colonización de *Glomus* (Akkopru y Demir, 2005; Barea, 1998).

La severidad de la enfermedad en la última evaluación varió entre un 4.99 y 14.08%, y ésta fue influenciada por las poblaciones de los antagonistas en la raíz. Todos los antagonistas redujeron la severidad de la enfermedad en las evaluaciones iniciales por lo que no se observó diferencia significativa entre éstos, sólo el testigo fue diferente estadísticamente. El tratamiento químico no presentó incidencia de la enfermedad en la

primera evaluación, esto concuerda con lo reportado por Díaz-Franco y Ortegón-Morales (1999) al evaluar fungicidas para el control de la rabia del garbanzo. En la evaluación final las diferencias en severidad de la enfermedad estuvieron correlacionadas con las poblaciones de antagonistas en la raíz, ya que los tratamientos con menor colonización de *Trichoderma* spp. así como de *G. intraradices* presentaron índices de severidad más altos, esto se presentó de igual manera en los tratamientos *B. subtilis*-*G. intraradices* y *P. fluorescens*-*G. intraradices*. El tratamiento químico, que en la primera evaluación no presentó incidencia de la enfermedad, registró similar severidad que los antagonistas en la última evaluación. Los tratamientos *T. harzianum* (T-22)-*G. intraradices* y *T. lignorum* CIAD 06-540903-*G. intraradices* presentaron mayor severidad de la enfermedad que el resto de los antagonistas, así como menor formación de micorriza.

Estos resultados demuestran que grupos de microorganismos habitantes de la rizosfera, como son los hongos formadores de micorrizas pueden coexistir con rizobacterias y algunas cepas del género *Trichoderma* sin exhibir un efecto adverso entre ellos, además de que la reducción de la severidad de la enfermedad es atribuida a las poblaciones de antagonistas en la raíz. En estudios posteriores se podrían investigar las posibles interacciones de *G. intraradices* con cepas de *Trichoderma* spp. que presenten diferentes niveles de agresividad.

BIBLIOGRAFIA

- Akkopru, A. and Demir, S. 2005. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Phytopathology* 153: 544-550.
- Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. A.G.T. Editor, S.A. México. 491 pp.
- Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'Gara, F., and Azcon-Aguilar, C. 1998. Impact on arbuscular micorriza of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol* 64:2304-2307.
- Barnett, H.L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated general of imperfect fungi. Fourth Edition. Burgess Publishing Company, Minnesota USA. 218 p.
- Bell, D., Wells, H. and Markman, C. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Booth, C. 1977. *Fusarium*. Laboratory Guide for the identification of the major species. C. M. I. Kew, Surrey, England.
- Carrillo F. A., 2004. Alternativa biológica para el control de enfermedades radiculares (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*) del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa. Memoria Foro Regional de Garbanzo. Guamúchil, Sinaloa.
- Datnoff, L.E., Nemecek, S., and Pernezny, K. 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological control* 5:427-431.
- Díaz-Franco, A. y Ortegón-Morales A.S. 1999. Productividad del garbanzo mediante el tratamiento de tebuconazol foliar y captan-carboxin en la semilla. *Rev. Mex. Fitopatología* 16:55-58.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press 794-809 p.
- García-Estrada, R., Carrillo-Fasio, J.A. y Márquez-Zequera, I. 2004. Distribución e identificación de los patógenos relacionados con la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa. Memoria Foro Regional de Garbanzo (Fundación Produce Sinaloa) 23-25 pp.

- Jiménez-Díaz, R.M., Alcalá-Jiménez, A.R., Hervás, A, and Trapero-Casas, J.L. 1993. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* pathosystem. In: Arseniuk E, Goral T, eds. *Fusarium* Mycotoxins, Taxonomy, pathogenicity and Host Resistance. Proceedings of the 3rd European Seminar. Radzikov, Poland: Plant Breeding and Acclimatization Institute 87–94.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393.
- Hervas, A., Landa, B., Datnoff, L.E., and Jiménez-Díaz, R.M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13:166-176.
- INIFAP. 1998. El cultivo del garbanzo blanco en el centro de Sinaloa. Folleto para productores. No. 41. 2da. Ed. México Pp. 2-25.
- Kaur, N.P., and Muthamilan, A.N. 1992. Integrated control of chickpea wilt complex by *Trichoderma* and chemical methods in India. *Trop Pest manage* 38:372-375.
- Kumar, B.S.D., and Dube, S.C. 1992. Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biology and Biochemistry* 24:539-542.
- Landa, B.B., Hervás, A., Bettiol W., and Jiménez-Díaz, R. 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. *Phytoparasítica* 25(5): 305-318.
- Landa, B.B., Navas-Cortés, J.A., and Jiménez-Díaz, R.M. 2004. Integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94: 946-960.
- Linderman, R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: The mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78:366-371.
- Meyer, J.R., and Linderman, R.G. 1986. Responce of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida*. *Soil Biology and Biochemistry* 18:191-196.
- Phillips, J. and Hayman, M. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Rodríguez, S. L. 2005. Producción y formulación de *Bacillus subtilis* CPA como agente de control biológico. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. 18-23 pP.

Rousseau, A., Benhamou, N., Chet, I., and Piche, Y. 1996. Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86:434-443.

Serrano-Carreón, L., Balderas-Ruiz, K., Galindo, E., Rito-Palomares, M. 2002. Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58:170-174.

Sneb, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS PRESS. St Paul Minnesota. USA. 135 p.

Schaad, N.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Ed. Schaad, USA.

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.

CAPITULO 2

Quitinasas y β -1,3-Glucanasas de *Trichoderma* spp. Relacionadas con el Micoparasitismo Sobre *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*.

RESUMEN

Algunas especies del género *Trichoderma* son parásitos de hongos fitopatógenos y poseen una gran capacidad de producir enzimas que hidrolizan las paredes celulares de los mismos, lo cual ha sido relacionado con su habilidad de micoparasitismo. En el presente estudio, se aislaron 15 cepas de *Trichoderma* a partir de raíces de garbanzo, de las cuales, seis presentaron mayor capacidad de inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. La capacidad inhibitoria de las cepas de *Trichoderma* se relacionó con la producción de enzimas con actividad hidrolasa, siendo la cepa identificada como *T. lignorum* CIAD 06 540903 la que presentó la mayor inhibición de todos los patógenos y mayor actividad de quitinasa y proteasa. La cepa de *T. lignorum* fue evaluada en su actividad quitinasa y glucanasa en condiciones simuladas de micoparasitismo en presencia de micelio inactivo de *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. La β -1,3-glucanasa puede estar principalmente involucrada en el micoparasitismo de *T. lignorum* CIAD 06 540903 ya que su actividad fue significativamente mayor en respuesta a la presencia del micelio de los fitopatógenos y fue 10 veces mayor que la actividad quitinasa.

Palabras clave: *Trichoderma*, control biológico.

ABSTRACT

The agricultural importance of the genus *Trichoderma* is that some of their species are mycoparasites of phytopathogenic fungi causing chick-pea wilt (*F. oxysporum*, *S. rolfsii* and *R. solani*). In this study, 15 strains of *Trichoderma* from chickpea root were isolated, six of them showed inhibition of micelial growth of *F. oxysporum*, *S. rolfsii* and *R. solani*

in vitro. The micelial inhibition was correlated with the capacity of enzymatic activity of chitinase, proteinase and glucanase. The isolate *T. lignorum* CIAD 06 540903 showed greatest percentage of inhibition against the three phytopathogenic fungi and highest chitinase and proteinase activity. The isolate *T. lignorum* was evaluate under simulated conditions of mycoparasitism *in vitro* with broth culture supplemented with inactive mycelia of *F. oxysporum*, *S. rolfsii*, *R. solani* and dextrose, as control. It appears that the activity of β -1,3- glucanase is playing an important role in the micoparasitism of *T. lignorum* because it activity was significantly greater in the presence of phytopatogenic mycelial and it was 10 times grater than the activity of chitinases.

Key words: *Trichoderma*, biological control.

INTRODUCCIÓN

Algunas especies del género *Trichoderma* han sido descritas como agentes de control biológico por su habilidad de antagonizar a una gran variedad de hongos fitopatógenos (Harman, 2005; De la Cruz *et al.*, 1995). Se ha propuesto que los mecanismos por los cuales *Trichoderma* inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos, son la producción de antibióticos, la competencia por nutrientes, el estímulo de los mecanismos de defensa de la planta, el micoparasitismo y una combinación de éstos (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998). El micoparasitismo se considera uno de los principales mecanismos de la actividad antagónica de *Trichoderma* (Inbar y Chet, 1995), y en algunos aislamientos de *T. harzianum*, este micoparasitismo se ha relacionado con la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas y proteasas frente a sustratos comerciales de laminarina y quitina o cuando son cultivados en presencia de micelio de hongos patógenos (De la Cruz *et al.*, 1992).

Las enzimas extracelulares β -1,3-glucanasas y quitinasas participan en el proceso de rompimiento de la pared celular de los hongos (El-Katatny *et al.*, 2000), debido a que la quitina y β -1,3-glucanos son los principales componentes estructurales de la pared

celular de la varias especies de hongos (Duran y Nombela, 2004). Las β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39) han sido identificadas y estudiadas en hongos, bacterias, actinomicetos y plantas superiores. Algunas β -1,3-glucanasas de hongos son producidas de manera constitutiva y mientras que la producción de otras se encuentra regulada durante el proceso de micoparasitismo (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998). Las quitinasas (EC 3.2.1.30) están distribuidas ampliamente en la naturaleza y juegan un papel importante en la degradación de la quitina de diferentes microorganismos (Harman, 2005). Es por ello que la actividad lítica de algunas cepas de *Trichoderma* sobre paredes celulares de hongos fitopatógenos ha sido correlacionada con el grado de control de estos fitopatógenos *in vivo* (De la Cruz *et al.*, 1992).

Los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* se consideran destructivos ya que causan daños severos en tallos y raíces de muchos cultivos de importancia económica. El control de estos patógenos con productos químicos no resulta práctico, debido a que estos microorganismos patógenos tienen la habilidad de formar estructuras de resistencia y de generar nuevas razas tolerantes a los productos químicos (Benhamou y Chet, 1996). Actualmente se comercializan diferentes fungicidas biológicos a base de *Trichoderma* spp. No obstante, es importante la búsqueda continua de especies del género *Trichoderma* con actividad biocontroladora sobre hongos fitopatógenos, los cuales pueden ser extraídos de microambientes donde deben ejercer su actividad.

Los objetivos del presente trabajo fueron i) relacionar la producción de quitinasas, proteasa y glucanasas con la actividad antagonista en 6 cepas de *Trichoderma* spp., y seleccionar la cepa con la mayor correlación antagonismo-actividad enzimática para ser cultivada en condiciones simuladas de micoparasitismo utilizando la pared celular de los patógenos *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani* para conocer su potencial de producción de enzimas hidrolíticas.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de Antagonistas y Patógenos

Se realizó la colecta de raíces para el aislamiento de las cepas de *Trichoderma* y de los patógenos en diversas localidades de la zona productora de garbanzo del estado de Sinaloa. Se colectaron raíces de garbanzo tanto de plantas sanas como de plantas que presentaban síntomas leves de la enfermedad. El aislamiento de los patógenos radiculares se realizó siguiendo la metodología de Booth (1977). Las raíces se lavaron con agua corriente y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2%, se lavaron repetidamente con agua destilada estéril y se secaron en flujo de aire laminar estéril, se cortaron pequeños trozos de tejido radicular y se cultivaron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) a 25°C por siete días. Los microorganismos fitopatógenos se aislaron e identificaron con diferentes claves taxonómicas (Booth, 1977; Barnett y Hunter, 1998; Sneh *et al.*, 1991). El aislamiento de las cepas de *Trichoderma* se realizó de acuerdo a la metodología de Alexander (1994). Se retiró el exceso de suelo de las raíces y estas se cortaron en segmentos de 1cm, a 50g de raíces se les agregaron 450ml de agua destilada estéril, se agitaron por 10 minutos y se realizaron diluciones seriadas, finalmente se sembraron alícuotas en medio PDA acidificado. Los antagonistas y patógenos aislados se cultivaron en medio PDA inclinado a 25°C durante 72 horas, y para su conservación se agregó aceite mineral y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Selección e Identificación de Antagonistas

Se aislaron 15 cepas de *Trichoderma* y se realizaron cultivos duales en PDA para seleccionar las de mayor porcentaje de inhibición *in vitro* contra el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*, según la metodología de Bell *et al.* (1982). Esta consistió en colocar en dos extremos de una caja petri con PDA discos de 5mm de

diámetro de medio de cultivo con crecimiento activo de micelio del antagonista y en el centro un disco 5mm de diámetro de medio de cultivo con el patógeno. Se utilizó un testigo conteniendo sólo el patógeno. Las cajas se incubaron a 25°C, hasta que el crecimiento micelial del testigo llenó la caja. El porcentaje de inhibición se determinó con respecto al testigo. Se realizaron cinco réplicas en un diseño aleatorizado completo. Las cepas de *Trichoderma* que mostraron los mayores índices de inhibición micelial de los patógenos se identificaron con las claves de Domsch *et al.* (1980), y se utilizaron para determinar la producción de enzimas con actividad quitinasa, β -1,3- glucanasa y proteasa.

Inducción de Producción de Enzimas

Para inducir la producción de enzimas extracelulares en las cepas seleccionadas, se utilizó la metodología de Harman *et al.* (1993). Las cepas fueron crecidas en un medio líquido mineral conteniendo 10g de KNO₃, 5g de KH₂PO₄, 2.5g de MgSO₄·7H₂O, 2mg de FeCl₃, 10g de quitina de crustáceo, 150ml de jugo VB, 10g de polivinilpirrolidona y se aforó a 1000ml con agua destilada. El medio se ajustó a pH 6 y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos, posteriormente se inoculó con un disco de medio de cultivo de 5mm de diámetro conteniendo micelio y esporas de 4 días de edad y finalmente se colocó en un agitador rotatorio a 150 rpm a 25°C por 6 días. La biomasa del hongo se separó del medio de cultivo por centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C y las partículas residuales se separaron por filtración con un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A). Los extractos enzimáticos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Actividad Enzimática por Difusión en Agar

La actividad de las enzimas extracelulares quitinasas, glucanasas y proteasas se determinó con la técnica semicuantitativa de difusión radial en placas de agarosa descrita por Matsumoto *et al.* (2003). La composición del medio para evaluar la actividad quitinasa consistió en 0.02% de quitina y 0.8% de agarosa en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 6; para actividad β -1,3- glucanasa se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa 0.02% y 0.8% de agarosa en amortiguador de fosfato de sodio 25 mM pH 7 y para proteasas se utilizó 3% de gelatina, 1% de caldo nutritivo y 0.8% de agarosa en agua destilada. La agarosa y el sustrato fueron disueltos en microondas. En cada caja petri de 90mm se agregaron 25ml de medio, posteriormente se hicieron pozos con un sacabocados de 6mm de diámetro en cada pozo se colocó 50 μ L de extracto enzimático. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Para observar los halos de actividad quitinasa y β -1,3- glucanasa las placas fueron inundadas con una solución de rojo congo 0.1% por 10 minutos, posteriormente las placas se lavaron tres veces con una solución de NaCl 1M y los halos de actividad se midieron con un vernier. Los halos de actividad proteasa se hicieron visibles sin ningún tratamiento. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que hidroliza un milímetro de sustrato en placa en las condiciones mencionadas. Se realizaron cuatro réplicas por tratamiento.

Obtención de Pared Celular de Hongos Patógenos

Para obtener la pared celular de los microorganismos fitopatógenos, inicialmente se cultivaron en caldo papa-dextrosa (200g de papa y 10g dextrosa en 1000ml de agua) en un agitador rotatorio a 110 rpm durante 7 días a 25°C. Se realizó una termólisis micelial a 121°C durante 15 minutos, se enfrió, se centrifugo a 3000 rpm durante 15 minutos, el sedimento se lavó en con acetona y se colocó en estufa a 50°C por 48 horas (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998).

Inducción Enzimática en Condiciones Simuladas de Micoparasitismo

Se seleccionó la cepa con la mayor correlación antagonismo-actividad enzimática en placa, y se cultivó en condiciones simuladas de micoparasitismo utilizando micelio inactivo de *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii*. Se utilizó la metodología de Harman *et al.* (1993), solo se sustituyó la quitina de crustáceo por la pared celular de los patógenos. Para la inducción en medio de cultivo de las enzimas extracelulares, se creció la cepa seleccionada con pared celular de *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii* y dextrosa. Los cultivos se replicaron cinco veces. Los extractos enzimáticos se obtuvieron por filtración en membrana de 0.2 micras y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Actividad Enzimática

Se determinó la actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa por el método de azúcares reductores descrito por Gross (1982). Se utilizó quitosano al 0.5% como sustrato para quitinasa y laminarina al 0.5% para β -1,3-glucanasa. La mezcla de reacción consistió de 1ml de amortiguador de acetato de sodio 50mM pH 6, 1ml de sustrato y 500 μ L de extracto enzimático, la cual se incubó a 37°C durante 40 minutos, midiendo en intervalos de cada 10 minutos la velocidad de producción de extremos reductores. La reacción se detuvo con 1ml de amortiguador de boratos 0.1M pH 9 y 200 μ L de 2-cianoacetamida como agente cromóforo. Los tubos se colocaron en agua hirviendo por 10 minutos, se enfriaron y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Cary I-E (Varian Inc) a 272 nm. La liberación de extremos reductores se calculó a partir de un estándar de acetilglucosamina para quitinasas y glucosa para β -1,3-glucanasa. Una unidad de enzima quitinasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la

liberación de 1µmol de acetilglucosamina por minuto. Una unidad de enzima β-1,3-glucanasas se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1µmol de glucosa por minuto. Los resultados se expresan en U/mg de proteína. El contenido de proteína se determinó con el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo de Bio-Rad y albúmina de suero bovino (Sigma) como estándar.

Análisis Estadísticos

En las variables de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial *in vitro* y actividad enzimática, se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey a un $\alpha = 0.05$ en el paquete estadístico Minitab 14.

RESULTADOS

Selección e Identificación de Antagonistas

Se colectaron 15 cepas de *Trichoderma* de los aislamientos de las muestras de raíz de garbanzo. No obstante, las seis que presentaron mayor inhibición *in vitro* de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *R. solani* y *S. rolfsii* (Cuadro 5), fueron identificadas como: *Trichoderma viridae* (CIAD 01-570903), *Trichoderma lignorum* (CIAD 02-590903), *Trichoderma viridae* (CIAD 03-580903), *Trichoderma harzianum* (CIAD 04-560903), *Trichoderma harzianum* (CIAD 05-550903) y *Trichoderma lignorum* (CIAD 06-540903). Las dos cepas identificadas como *T. lignorum* CIAD 06-540903 y CIAD 02-590903 presentaron los mayores porcentajes de inhibición tanto de *F. oxysporum* con 65.1 y 61.2%, así como de *R. solani* con 74.6 y 72.2% respectivamente. El crecimiento micelial

de *S. rolfii* fue inhibido en mayor medida por las cepas de *T. lignorum* CIAD 06-540903 con un 79.6%, seguido por la cepa *T. harzianum* CIAD 05-550903 con un 79.1%. La cepa de *T. lignorum* CIAD 06-540903 fue diferente estadísticamente al resto de las cepas en la inhibición micelial en todos los patógenos. Las dos cepas de *T. viridae* CIAD 01-570903 y CIAD 03-580903 presentaron los menores porcentajes de inhibición de los fitopatógenos.

Cuadro 5. Inhibición del desarrollo micelial de los patógenos por las cepas de *Trichoderma* expresado en porcentaje. Cada media corresponde a cinco réplicas.

Antagonistas	Inhibición <i>F. oxysporum</i> %	Inhibición <i>S. rolfii</i> %	Inhibición <i>R. solani</i> %
<i>T. viridae</i> (CIAD 01-570903)	44.1d	62.5e	70.5b
<i>T. lignorum</i> (CIAD 02-590903)	61.2ab	76.7bc	74.6ab
<i>T. viridae</i> (CIAD 03-580903)	55.2c	68.1d	62.6c
<i>T. harzianum</i> (CIAD 04-560903)	55.2c	74.2c	73.5b
<i>T. harzianum</i> (CIAD 05-550903)	60.1b	79.1ab	72.2b
<i>T. lignorum</i> (CIAD 06-540903)	65.1a	79.6a	80.9a

Valores con la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey

Evaluación Enzimática en Placa

Las seis cepas de *Trichoderma* presentaron la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas como son; quitinasas, glucanasas y proteasas; sin embargo, la mayor actividad quitinasa en placa la presentó la cepa de *T. lignorum* CIAD 06-540903 con 18.02 unidades (Cuadro 6), las cepas de *T. viridae* CIAD 01-570903 y CIAD 03-580903 mostraron menor actividad quitinasa con 12.71 y 14.47 unidades respectivamente con respecto a la cepa *T. lignorum* CIAD 06-540903. La mayor actividad β -1,3-glucanasa la expresaron las cepas de *T. lignorum* CIAD 02-590903 y CIAD 06-540903 y *T. harzianum* CIAD 05-550903 con 26.35, 25.36 y 25.48 unidades, respectivamente. La

cepa *Trichoderma harzianum* CIAD 04-560903 exhibió la menor actividad tanto β -1,3-glucanasa como proteasa con 20.90 y 17.33 unidades de actividad respectivamente, mientras que la mayor actividad proteasa la mostró la cepa *T. lignorum* CIAD 06-540903 con 28.8 unidades.

Cuadro 6. Unidades de actividad quitinasa, β -1,3-glucanasa y proteasa de los filtrados de cultivos de las cepas de *Trichoderma*. Cada media corresponde a cuatro réplicas.

Actividad enzimática en placa			
Cepas de <i>Trichoderma</i>	Quitinasa	β-1,3-glucanasa	Proteasa
<i>T. viridae</i> (CIAD 01-570903)	12.71c	23.71abc	21.15bc
<i>T. lignorum</i> (CIAD 02-590903)	15.79ab	26.35a	20.10bc
<i>T. viridae</i> (CIAD 03-580903)	14.47bc	21.85bc	24.52ab
<i>T. harzianum</i> (CIAD 04-560903)	16.80ab	20.90c	17.73c
<i>T. harzianum</i> (CIAD 05-550903)	16.25ab	25.48ab	25.23ab
<i>T. lignorum</i> (CIAD 06-540903)	18.02a	25.36ab	28.80a

Valores con la misma letra no difieren significativamente ($P=0.05$) con la prueba de Tukey

Actividad Enzimática en Condiciones Simuladas de Micoparasitismo

La cepa *T. lignorum* CIAD 06-540903 produjo quitinasas y β -1,3-glucanasas cuando creció en presencia de la pared celular de los patógenos como su principal fuente de carbono. El nivel de actividad de ambas enzimas varió dependiendo de la pared celular utilizada (Cuadro 7). La mayor actividad β -1,3-glucanasa se presentó frente a la pared celular de *R. solani* con 11.29 U/mg, en cambio en presencia de dextrosa sólo se presentó una actividad de 4.38 U/mg la cual fue menor al resto de los tratamientos. El nivel de actividad quitinasa varió de 0.92 a 1.15 U/mg, la mayor actividad la presentó la pared celular de *R. solani* con 1.15 U/mg y la menor actividad la indujo la pared celular de *S. rolfisii* con 0.92 U/mg. No se encontraron diferencias significativas en la actividad

quitinasa entre los diferentes medios de cultivo. La actividad β -1,3- glucanasa se presentó hasta 10 veces más que la actividad quitinasa.

Cuadro 7. Efecto de la fuente de pared celular sobre la actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa de la cepa de *T. lignorum* CIAD 06 540903 en condiciones simuladas de micoparasitismo.

Actividad Enzimática (U/mg)	Fuente de la pared celular			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>R. solani</i>	Dextrosa
Quitinasa	1.01a	0.92a	1.15a	0.95a
β -1,3-glucanasa	10.05a	7.68b	11.29a	4.38c

Valores con la misma letra por filas no difieren significativamente ($P \leq 0.05$) con la prueba de Tukey

DISCUSIÓN

El micoparasitismo de las especies de *Trichoderma* ha sido descrito como uno de sus principales mecanismos en su actividad antagonista contra hongos fitopatógenos. La actividad lítica está dada principalmente por β -1,3- glucanasas y quitinasas (De la Cruz *et al.*, 1995; Harman *et al.*, 1993; Lorito *et al.*, 1993). Algunas especies de *Trichoderma* son capaces de parasitar a un amplio rango de hongos fitopatógenos con diferente composición y estructura de la pared celular, por lo cual las enzimas hidrolíticas tienen un papel importante en la destrucción de hongos fitopatógenos (El-Katatny *et al.*, 2000); además, entre las especies y cepas de *Trichoderma* existe una considerable variabilidad con respecto a su actividad antagonista, por lo que, la búsqueda de nuevas cepas con mayor efectividad antagónica continúa siendo de interés.

El objetivo principal de este trabajo fue encontrar cepas de *Trichoderma* con capacidad de antagonizar a un amplio rango de fitopatógenos, por lo que se inició con el

aislamiento de las cepas de *Trichoderma* y de los patógenos *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani*. Se logró el aislamiento de 15 cepas de *Trichoderma*, seis de las cepas exhibieron la mayor inhibición de los fitopatógenos en condiciones *in vitro*. Cepas de la especie *T. harzianum* y *T. viridae* son las más ampliamente estudiadas por su agresividad de micoparasitar fitopatógenos (Harman, 2005; Howell, 2003); sin embargo, en nuestro estudio la cepa de *T. lignorum* CIAD 06-540903 fue más efectiva tanto en la inhibición *in vitro* de todos los patógenos como en la mayor producción de quitinasas y proteasas además de presentar un alto nivel de actividad β -1,3-glucanasa. Los menores porcentajes de inhibición así como la menor actividad quitínasa la mostraron las cepas de *T. viridae*. De las enzimas extracelulares evaluadas la actividad quitínasa se correlacionó con la inhibición *in vitro* de los patógenos (Cuadro 8). Madi *et al.* (1997) evaluaron 12 cepas de *Talaromyces flavus* y reportaron una correlación positiva de actividad quitínasa con el antagonismo *in vitro* y reducción de la enfermedad contra *S. rolfsii*, y se lo atribuyen a la actividad que desarrollan las quitinasas sobre las puntas hifales de este patógeno, en nuestro estudio se presentó una alta correlación de actividad quitínasa con la inhibición de *S. rolfsii* (Fig. 1). El patógeno *F. oxysporum* mostró la menor susceptibilidad *in vitro* a todos los antagonistas. Schoffemeer *et al.* (1999) mencionan que la hifa de este patógeno está normalmente cubierta de una capa de proteínas que representa entre el 7 y 8% del peso seco de la pared celular que cubre la capa interna de quitina y glucanos haciéndola más resistente a la actividad quitínasa y glucanasa. En contraste, en *S. rolfsii* el contenido de proteínas en la pared celular de la hifa es 2.7% (Chet *et al.*, 1967) y fue más susceptible al ataque de los antagonistas. La mayor actividad en placa de quitínasa y proteasa lo exhibió la cepa *T. lignorum* CIAD 06-540903, que además mostró la mayor inhibición *in vitro* de todos los fitopatógenos, la cepa *T. lignorum* CIAD 02-590903 mostró la mayor actividad β -1,3-glucanasa. Las cepas de *T. viridae* inhibieron en menor grado a los patógenos *in vitro* y se relacionó con el nivel más bajo de actividad enzimática en placa.

Cuadro 8. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre actividad enzimática de extractos de cultivo de las cepas de *Trichoderma* y su habilidad para inhibir el crecimiento de los patógenos *in vitro*.

Actividad Enzimática	Coeficiente de correlación		
	Inhibición <i>F. oxysporum</i>	Inhibición <i>S. rolfsii</i>	Inhibición <i>R. solani</i>
Quitinasa	0.879	0.916	0.696
β -1,3-glucanasa	0.489	0.496	0.537
Proteasa	0.496	0.346	0.201

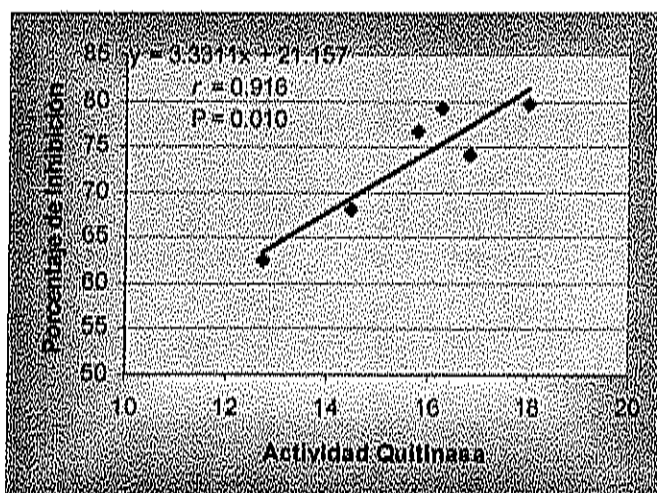


Figura 1. Correlación entre la habilidad de las cepas de *Trichoderma* para inhibir *in vitro* el crecimiento de *S. rolfsii* y su actividad quitinasa en placa.

Diversos estudios han reportado una alta actividad β -1,3- glucanasa y una menor actividad quitinasa cuando *Trichoderma* crece en medio mineral complementado con micelio o pared celular de fitopatógenos (Hadar *et al.*, 1979; El-Katatny *et al.*, 2000). En nuestro estudio, la cepa de *T. lignorum* produjo quitinasas cuando creció en todos los medios de cultivo evaluados. La pared celular de *S. rolfsii* que según reporta Chet *et al.* (1967) con un contenido de quitina del 3.5% obtuvo la más baja actividad quitinasa, por lo que la pared celular de *R. solani* y *F. oxysporum* con un contenido de quitina de 8%

(Hadar *et al.*, 1979; Schoffemeer *et al.*, 1999) indujeron ligeramente mayor actividad quitinasa que el medio con dextrosa. La influencia de la pared celular de *S. rolfsii* en la actividad quitinasa fue muy superior a la reportada por El-Katatny *et al.* (2000) quienes evaluaron una cepa de *T. harzianum* frente a micelio de *S. rolfsii* como única fuente de carbono y ellos describen su actividad quitinasa como alta y la atribuyen a un alto contenido de quitina en la pared celular de *S. rolfsii*, la cual contradice lo reportado por Chet *et al.* (1967). La actividad quitinasa con la pared celular de *R. solani* fue superior hasta 255 veces a la reportada por Hadar *et al.* (1979) al evaluar una cepa de *T. harzianum* y mencionan que la quitina sólo representa entre el 6-8% de la pared celular de este patógeno. Tweddell *et al.* (1994) reportan una alta actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa en una cepa de *Stachybotrys elegans* cuando creció tanto con pared celular de *R. solani* como en ausencia de una fuente de carbono. Cuando *Trichoderma* crece en medio mineral complementado con glucosa produce de manera constitutiva un nivel bajo de actividad quitinasa, específicamente del tipo exoquitinasa (Inbar y Chet *et al.*, 1995), lo cual puede explicar la actividad quitinasa encontrada en el medio complementado con dextrosa que fue estadísticamente similar a la inducida por la pared celular de los patógenos. Otro punto que puede explicar la baja actividad quitinasa es el bajo contenido de quitina en la pared de estos patógenos según los reportes mencionados anteriormente

La actividad β -1,3- glucanasa fue hasta 10 veces mayor a la actividad quitinasa. La pared celular de la mayoría de los hongos patógenos está compuesta principalmente por glucanos, por lo tanto se considera que pueden participar de manera importante las β -1,3- glucanasas en la degradación de la pared celular de los microorganismos fitopatógenos; además, la actividad β -1,3- glucanasa es dependiente de la cantidad de glucanos presentes en el hospedero (Vázquez -Garcidueñas *et al.* 1998). En nuestro estudio, la pared celular de *R. solani* presentó la mayor actividad β -1,3- glucanasa y fue superior a la reportada en otros estudios (Hadar *et al.*, 1979; Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 1998). De las paredes celulares de los patógenos utilizadas, la de *S. rolfsii* indujo la menor actividad, sin embargo fue mayor a la reportada por El-Katatny *et al.* (2000). Una cepa de *T. harzianum* produjo mayor actividad quitinasa cuando creció sobre micelio de

R. solani que cuando creció sobre micelio de *S. rolfsii* (Elad *et al.*, 1982), lo que concuerda con nuestros resultados. La pared celular de estos patógenos está compuesta principalmente por glucanos, pero no se especifica la proporción correspondiente a β -1,3-glucanos (Chet *et al.*, 1967; Hadar *et al.*, 1979; Schoffemeer *et al.*, 1999). El tratamiento complementado con dextrosa mostró actividad β -1,3-glucanasa, lo que sugiere que la inducción de esta enzima en *Trichoderma* no requiere β -1,3- glucanos, esto es similar a lo reportado en otros estudios con *Trichoderma* (Lorito *et al.*, 1993; El-katatny *et al.*, 2000), y por otras especies como *Gliocladium virens* (Tilburg y Thomas, 1993) y se atribuye a que esta enzima se produce de manera constitutiva; sin embargo, en nuestros resultados se observó que la actividad de β -1,3-glucanasa fue inducida en respuesta a la presencia de la pared celular de los patógenos.

En conclusión, en la cepa de *T. lignorum* los niveles de actividad quitinasa y β -1,3-glucanasa fueron sólo parcialmente reprimidas en presencia de dextrosa, lo cual sugiere que cierta cantidad de enzima es producida de manera constitutiva; otra explicación es que la producción de estas enzimas en condiciones no inducidas podrían estar relacionadas con el propio metabolismo de la pared del micoparásito (Tweddell *et al.*, 1994); además, las β -1,3- glucanasas aparecen como las principales enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular de los patógenos. El hecho de que se presentó una baja actividad quitinasa no descarta que esta enzima represente un papel fundamental en el proceso de micoparasitismo ya que sus niveles de actividad en placa exhibieron una correlación positiva con el antagonismo *in vitro* de los patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. A.G.T. Editor, S.A. México. 491 pp.
- Benhamou, N., and Chet, I. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* 86: 405-416.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. (1972). Ilustred genera of imperfect fungi (3^a Ed.). Minneapolis: Burgess Publishing Company.
- Bell, D., Wells, H., and Markman, C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382
- Booth, C. 1977. *Fusarium*. Laboratory Guide to the identification of the major species. C. M. I. Kew, Surrey, England.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochemistry* 72:248-254.
- Chet, I., Henis, Y., and Mitchell, R. 1967. Chemical composition of hyphal and sclerotial wall of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Canadian Journal of Microbiology* 13:137-142
- De La Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A. and Llobell, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *European Journal Biochemistry* 206:859-867.
- De La Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T., and Llobell, A. 1995. Purification and characterization of an endo- β -1,6-glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology* 117:1864-1871.
- Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press. 794-809 p.
- Duran, A., and Nombela, C. 2004. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. *Microbiology* 150:3099-3103.
- Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28:719-725
- El-Katatny, M.H., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katatny, M.S., and Gubitz, G.M. 2000. Production of chitinases and -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology Biotechnology* 38:173-180.

Gross, K.C. 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. Hortscience 17:933-934.

Hadar, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69:64-68.

Harman, G.E. 2005. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* Phytopathology 96: 190-194.

Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83:313-318.

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

Inbar, J., and Chet, I. 1995. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Microbiology 141:2823-2829.

Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, M.R., Tronsmo, A., Woo, S.L., and Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology 83:302-307

Madi, L., Katan, T., Katan, J., and Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. Phytopathology 87:1054-1060.

Matsumoto, H., Muroi H., Umehara M., and Tsuyumu, S. 2003. Peh production, flagellum synthesis, and virulence reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by mutation in a homologue of *cytR*. Molecular Plant-Microbe Interactions 16:389-397.

Schoffemeer, E.A.M., Klis, F.M., Sietsma, J.H., and Cornelissen, B.J.C. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology 27:275-282.

Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS PRESS. St Paul Minnesota. USA. 135 p.

Tilburg, A.U.B., and Thomas, M.D. 1993. Production of extracellular proteins by control fungus *Gliocladium virens*. Applied and Environmental Microbiology 59:236-242.

Tweddell, R.J., Jabaji-Hare, S.H., and Charest, P.M. 1994. Production of chitinases and β -1,3- glucanases by *Stachybotrys elegans*, a micoparasite of *Rhizoctonia solani*. Applied and Environmental Microbiology 60:489-495.

Vazquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C.A., and Herrera-Estrella, A. 1998. Analysis of the β -1,3-glucoanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 64:1442-1446

Vazquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C.A., and Herrera-Estrella, A. 1998. Analisis of the β -1,3-gluconolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 64:1442-1446