



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Ingeniería Agrícola y del Medio Rural

“Estudio y desarrollo de bio-inoculante
basado en *Trichoderma* spp. en semilla de
garbanzo de Fuentesauco (IGP) para el
control efectivo de la rabia (*Ascochyta*
rabiei, Pass)”

Alumno: Javier Morcuende Herrero

Tutor: Jorge Poveda Arias

Cotutor: Jorge Martín García

Directora: Felicidad López Sainz

JUNIO DE 2024

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. SITUACIÓN AGRÍCOLA ACTUAL.....	3
2.2. EL GARBANZO.....	4
2.2.1. <i>Taxonomía y biología</i>	4
2.2.2. <i>Cultivo y producción</i>	5
2.2.3. <i>El garbanzo de Fuentesauco (IGP)</i>	12
2.3. LA RABIA DEL GARBANZO	13
2.4. <i>TRICHODERMA</i>	16
2.4.1. <i>Taxonomía y biología</i>	16
2.4.2. <i>Mecanismos de acción</i>	16
2.4.3. <i>Formulación y aplicación de Trichoderma</i>	18
2.4.4. <i>Importancia agrícola y mercado</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. MATERIAL FÚNGICO UTILIZADO	21
4.2. MEDIOS DE CULTIVO	22
4.3. ENSAYO DE ANTAGONISMOS <i>IN VITRO</i>	23
4.3.1. <i>Procedimiento experimental</i>	23
4.3.2. <i>Análisis de imagen</i>	25
4.4. ENSAYO <i>IN PLANTA</i> CON INOCULACIÓN RADICULAR DE <i>TRICHODERMA</i>	26
4.4.1. <i>Siembra</i>	26
4.4.2. <i>Inoculación de Trichoderma</i>	27
4.4.3. <i>Inoculación del patógeno</i>	28
4.4.4. <i>Toma de datos</i>	29
4.5. ENSAYO DE COMPATIBILIDAD DE ESPORAS DE <i>T. HARZIANUM</i> CON LOS RECUBRIMIENTOS.....	30
4.5.1. <i>Material utilizado</i>	30
4.5.2. <i>Procedimiento experimental</i>	31
4.6. ENSAYO DE COMPATIBILIDAD DE LAS SEMILLAS CON LOS RECUBRIMIENTOS.....	31
4.6.1. <i>Material utilizado</i>	31
4.6.2. <i>Procedimiento experimental</i>	31
4.7. ENSAYO <i>IN PLANTA</i> CON EL RECUBRIMIENTO GA 1% Y <i>T. HARZIANUM</i>	32
4.7.1. <i>Material utilizado</i>	33
4.7.2. <i>Procedimiento experimental</i>	33
4.8. ENSAYO DE PRODUCCIÓN.....	34
4.8.1. <i>Material utilizado</i>	34
4.8.2. <i>Procedimiento experimental</i>	34
4.8.3. <i>Análisis estadístico</i>	35
5. RESULTADOS	36
5.1. ENSAYO DE ANTAGONISMOS <i>IN VITRO</i>	36
5.1.1. <i>Medio de cultivo PDA</i>	36
5.1.2. <i>Medio de cultivo CSMDA</i>	39
5.2. ENSAYO <i>IN PLANTA</i> CON INOCULACIÓN RADICULAR DE <i>TRICHODERMA</i>	41
5.2.1. <i>Análisis de daños causados por el patógeno</i>	41

5.2.2.	<i>Análisis de supervivencia de las plantas</i>	42
5.3.	ENSAYO DE COMPATIBILIDAD DE ESPORAS DE <i>T. HARZIANUM</i> CON LOS RECUBRIMIENTOS.....	44
5.4.	ENSAYO DE COMPATIBILIDAD DE LAS SEMILLAS CON LOS RECUBRIMIENTOS.....	47
5.5.	ENSAYO IN PLANTA CON EL RECUBRIMIENTO GA 1% Y <i>T. HARZIANUM</i>	50
5.6.	ENSAYO DE PRODUCCIÓN.....	51
6.	DISCUSIÓN	52
7.	CONCLUSIONES	57
8.	BIBLIOGRAFÍA	58

1. RESUMEN

El garbanzo (*Cicer arietinum*) es un cultivo de secano ampliamente distribuido en Castilla y León, alcanzando una producción anual de 7,8 millones de toneladas. La Indicación Geográfica Protegida Garbanzo de Fuentesauco incluye a un cultivo desarrollado en el sur de la provincia de Zamora, de gran importancia agronómica, económica y cultural. Actualmente, este cultivo se enfrenta a importantes desafíos, entre los cuales destaca la enfermedad conocida como rabia del garbanzo, causada por el hongo patógeno *Ascochyta rabiei*. Esta enfermedad afecta a hojas, tallos y vainas del cultivo y tiene graves impactos sobre la producción.

Diversas especies del género *Trichoderma* se han destacado como agentes de control biológico efectivos contra patógenos agrícolas. Por ello, este trabajo analiza su potencial para el control de la enfermedad de la rabia del garbanzo. La primera fase del estudio se centró en la caracterización de varias especies de *Trichoderma* para su potencial uso en el control biológico de *A. rabiei*, mediante ensayos de antagonismo directo *in vitro* y la activación de resistencia sistémica en plantas de garbanzo. Entre las especies evaluadas, *Trichoderma harzianum* EN1 demostró ser la cepa más eficaz.

En la segunda fase, se probaron distintos recubrimientos para aplicar los conidios de *T. harzianum* en semillas de garbanzo. La goma arábiga al 1% resultó ser el recubrimiento más adecuado, promoviendo de manera óptima la germinación de conidios y semillas.

La siguiente fase del estudio implicó aplicar este recubrimiento con conidios de *T. harzianum* a las semillas de garbanzo y evaluar la supervivencia de las plantas tras la infección con *A. rabiei*. Para simular condiciones de campo, el sustrato de crecimiento utilizado fue suelo recogido en parcelas de cultivo de la IGP Garbanzo de Fuentesauco, el cual no fue autoclavado. Se observó que las plantas tratadas con goma arábiga y *T. harzianum* mostraron significativamente la mayor tasa de supervivencia a lo largo de todo el ensayo.

Por último, se evaluó el impacto de la aplicación de *T. harzianum* a través del recubrimiento goma arábiga al 1% en la producción de garbanzos, los cuales fueron

crecidos en suelo de la IGP sin autoclavar y en ausencia de aplicación exógena del patógeno *A. rabiei*. No se observaron diferencias significativas, por lo que el impacto del recubrimiento y *T. harzianum* en el potencial productivo es limitado o nulo.

En este trabajo se ha podido apreciar el potencial de las especies de *Trichoderma*, especialmente *T. harzianum*, como agentes de biocontrol contra *A. rabiei*. La capacidad de estos hongos para incrementar la supervivencia de las plantas de garbanzo confirma su potencial como una herramienta valiosa para la agricultura sostenible. Además, la compatibilidad de los recubrimientos testados con la viabilidad y germinación tanto de los conidios de *Trichoderma* como de las semillas de garbanzo, evidencia un método prometedor para la aplicación práctica de estos agentes biológicos en campo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Situación agrícola actual

En la primera década del siglo XXI, el mundo se enfrenta a desafíos complejos e interrelacionados que tienen profundas implicaciones para la seguridad alimentaria global. Según un meta-análisis reciente, la población mundial se proyecta en aproximadamente 9.700 millones para 2050, con un crecimiento predominante en los países en desarrollo. La migración de las áreas rurales hacia las urbanas continúa aumentando significativamente, impulsando la urbanización acelerada. La globalización y el cambio climático están ejerciendo una influencia considerable en el sector agrícola, mientras que el crecimiento económico y la urbanización están transformando los patrones de consumo alimentario. Como resultado, se espera que la demanda global de alimentos aumente entre un 35% y un 56% entre 2010 y 2050, subrayando la urgencia de abordar estos desafíos para garantizar la seguridad alimentaria futura (van Dijk et al., 2021).

En los sistemas agrícolas se precisa un cambio para superar los desafíos que se han de abordar para erradicar el hambre y la pobreza, además de avanzar hacia producciones sostenibles. Entre tales desafíos, están el desigual crecimiento demográfico que se producirá en las próximas décadas, las amenazas que plantea el cambio climático, la intensificación de los desastres naturales y el aumento en las plagas y enfermedades transfronterizas, así como la necesidad de adaptación ante los grandes cambios que están sucediendo en los sistemas alimentarios globales (FAO, 2017).

El cambio climático ha hecho evidente que no basta con aumentar la producción agrícola; también es crucial adoptar estrategias que no comprometan al medio ambiente. Un componente de gran importancia para avanzar en este aspecto es la reducción del uso de productos fitosanitarios de síntesis química (fungicidas, herbicidas, insecticidas...), sustancias que son de gran importancia en la actualidad para garantizar la producción, pero que tienen graves impactos sobre el medio ambiente. El uso excesivo o inadecuado de productos fitosanitarios puede ocasionar riesgos para la calidad del suelo y de las aguas superficiales, la biodiversidad, los ecosistemas y la salud humana a través de residuos en

los alimentos (Tribunal de Cuentas Europeo, 2020). Actualmente urge la necesidad de generar prácticas agrícolas sostenibles apoyadas en la conservación de los recursos naturales, sin generar efectos dañinos en la salud humana y animal, contexto en el que los bioinoculantes son elementos clave (De los Ángeles, 2017).

2.2. El garbanzo

2.2.1. Taxonomía y biología

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una planta que se ubica dentro de la división de las Magnoliophyta, o plantas con flores, y es clasificado en la clase Magnoliopsida. Este cultivo pertenece al orden de las Fabales, integrándose en la familia Fabaceae, la cual agrupa a una extensa gama de plantas leguminosas. Dentro de esta familia, el garbanzo se sitúa en el género *Cicer* (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía del garbanzo.

Reino: Plantae
Clase: Angiospermae
Subclase: Dicotyledoneae
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Subfamilia: Faboideae
Tribu: Cicereae
Género: <i>Cicer</i>
Especie: <i>Cicer arietinum</i>

El garbanzo es una planta herbácea anual de aproximadamente 70 cm perteneciente al grupo de las leguminosas de grano. Se caracteriza por sus hojas pubescentes compuestas y alternas y sus flores papilionáceas blancas o violetas típicas de la familia Fabaceae. La planta desarrolla vainas pubescentes, puntiagudas e hinchadas, llegando a alcanzar hasta 3 cm de longitud y pudiendo contener hasta 3 semillas o garbanzos. El tamaño de las semillas oscila entre los 8-11 mm de largo, 6-8 mm de ancho, son asimétricas con el lóbulo radical prominente. Las raíces son pivotantes y el sistema radicular es profundo,

llegando a alcanzar los 2 metros (Almada-Ackermann et al., 2016). En cuanto a su reproducción, predomina fundamentalmente la autogamia, situándose el nivel de alogamia entorno al 1 % (Echevarría et al., 2019).

El garbanzo, como todas las leguminosas, establece relaciones simbióticas con *Rhizobium*, un género de bacterias capaces de transformar el nitrógeno atmosférico (N₂) en amoníaco (NH₃), que posteriormente la planta utiliza como fuente de nitrógeno (Van Rhijn & Jos Vanderleyden, 1995). El cultivo de garbanzo fija aproximadamente 50 kg/ha y año de nitrógeno atmosférico (del Moral et al., 1996). Dada esta asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, se conoce al cultivo de garbanzo como “mejorante del suelo”, en términos de estructura, control de la erosión y fertilidad (Ablanque et al., 2023).

2.2.2. Cultivo y producción

El garbanzo es una especie originaria de la región del Creciente Fértil, más precisamente en el sureste de Turquía, donde podría haber comenzado el proceso de domesticación (Almada-Ackermann et al., 2016). Este versátil cultivo se ha expandido por todo el mundo, dando lugar a una diversidad de variedades adaptadas a distintos entornos. En el presente subapartado se detallarán las características del cultivo del garbanzo en España, su importancia y su interés nutricional.

El periodo de siembra del garbanzo varía según la región y la variedad de garbanzo, realizándose entre los meses de noviembre y marzo, siendo más frecuente su siembra en primavera. La recolección se realiza de finales de junio o principios de julio, presentando un ciclo corto, generalmente de 4 meses (Rubio-Moreno et al., 2021).

El garbanzo es un cultivo con gran importancia en España, con una alta demanda, principalmente por ser una semilla con un alto valor nutritivo: rica en proteínas, carbohidratos y otras sustancias esenciales (Tabla 2). Cien gramos suministran 373 calorías y contienen el 19,4% de proteínas, el 5% de grasas, 145 mg de calcio, 6,7 mg de hierro, además de diversas vitaminas (Moreiras et al., 2013).

Tabla 2. Composición nutricional del garbanzo. Fuente: Moreiras et al., 2013.

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (70 g)	Recomendaciones día-hombres	Recomendaciones día-mujeres
Energía (Kcal)	373	261	3.000	2.300
Proteínas (g)	19,4	13,6	54	41
Lípidos	5	3,5	101-117	77-89
AG saturados (g)	Tr	Tr	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	2,08	1,46	67	51
AG poliinsaturados (g)	2,08	1,46	17	13
Cl8:2 Linoleico (g)	2,08	1,456	10	8
Hidratos de carbono (g)	55	38,5	375-413	288-316
Fibra (g)	15	10,5	>35	>25
Agua (g)	5,6	3,9	2.500	2.000
Calcio (mg)	145	102	1.000	1.000
Hierro (mg)	6,7	4,7	10	18
Magnesio (mg)	160	112	350	330
Zinc (mg)	0,8	0,6	15	15
Sodio (mg)	26	18,2	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	797	558	3500	3500
Fósforo (mg)	375	263	700	700
Selenio (pg)	2	1,4	70	55
Tiamino (mg)	0,4	0,28	1.2	0.9
Riboflavina (mg)	0,15	0,11	1.8	1.4
Equivalentes niacina (mg)	4,3	3	20	15
Vitamina B₆ (mg)	0,53	0,37	1.8	1.6
Folatos (µg)	180	126	400	400
Vitamina B₁₂ (µg)	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	4	2,8	60	60
Vitamina A: Eq.Retinol (µg)	32	22,4	1000	800
Vitamina D (µg)	0	0	15	15
Vitamina E (mg)	2,88	2	12	12

*Tr: Trazas

Para comprender la importancia del cultivo del garbanzo en España, Europa y de forma global, se realizará un análisis detallado de las tendencias en la producción y exportaciones de garbanzo, basado en los datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), EUROSTAT y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Se ha examinado la evolución de estos indicadores, identificando patrones significativos y cambios a lo largo del tiempo.

La producción global de garbanzo muestra una clara hegemonía de India, con una producción que excede los 9 millones de toneladas en el año 2022 (Figura 1), la mitad de la producción mundial de dicha legumbre (18 millones de toneladas). Este volumen

representa la mitad de la producción mundial total de esta legumbre, que asciende a 18 millones de toneladas, dato que refleja la importancia del garbanzo dentro de su economía y dieta nacional. Australia asume la posición de segundo productor global, con una producción que ronda los 2 millones de toneladas, lo cual nos indica una diferencia significativa de producción del gigante del sur de Asia con los países que le siguen. La Unión Europea ocupa el decimosegundo puesto a nivel mundial de producción de garbanzos, teniendo poca participación en el volumen del mercado global (FAO, 2022).

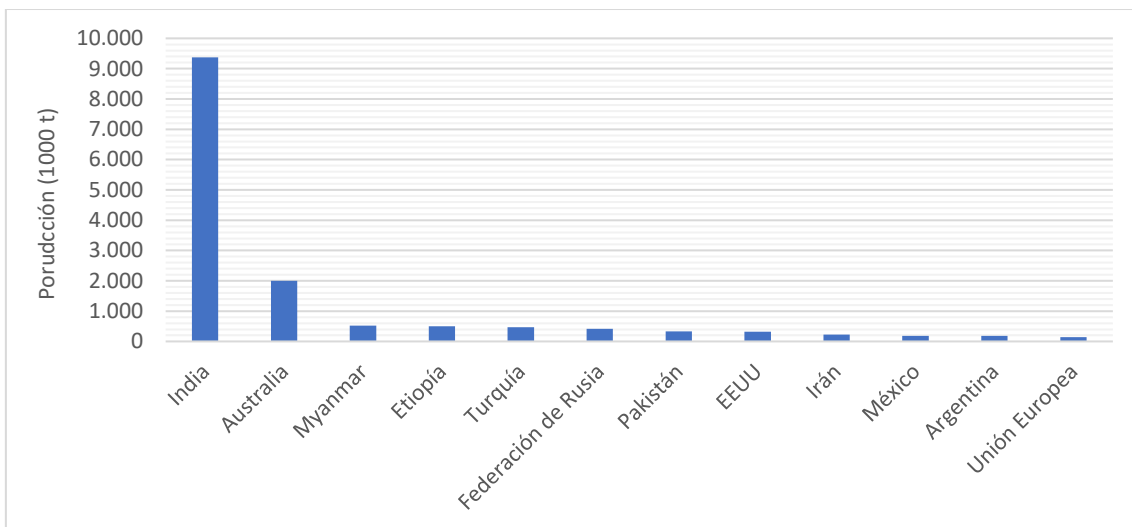


Figura 1. Principales países productores de garbanzo del mundo en 2022. Elaboración propia a partir de la fuente: FAO, 2022

En el mercado global, en el año 2022, Australia emerge como el principal exportador, con valores que superan los 350 millones de dólares (Figura 2), lo cual evidencia su dominio en el mercado de exportación de garbanzos. India y Canadá le siguen como principales exportadores, con valores de 225 y 203 millones de dólares, respectivamente, demostrando su fuerte presencia en el comercio internacional. India, en su caso, a pesar de ser la mayor productora del mundo, destina la mayor parte de su producción a satisfacer las necesidades de su población. La UE se posiciona en la novena posición, con unas exportaciones con valor de 74 millones de dólares (FAO, 2022).

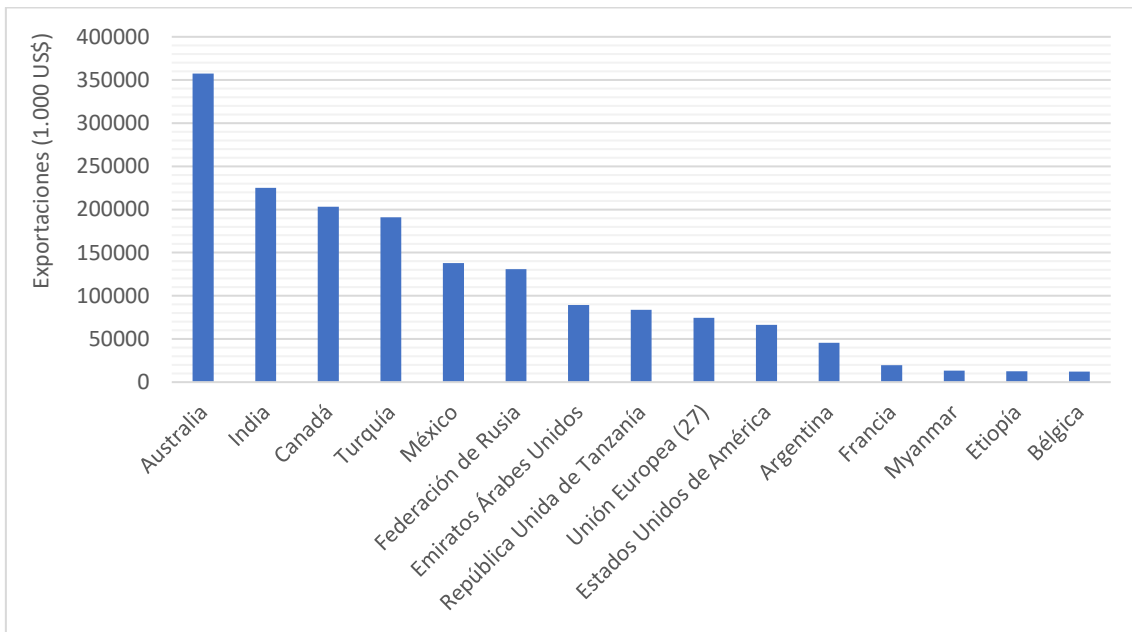


Figura 2. Principales países exportadores de garbanzo a nivel global en 2022. Elaboración propia a partir de la fuente: FAO, 2022

En cuanto a las importaciones, en el año 2022 Paquistán destaca como el principal importador mundial de garbanzos, seguido de cerca por la Unión Europea (Figura 3), lo que indica una fuerte demanda y un papel significativo de los garbanzos en la dieta de ambos territorios (FAO, 2022).

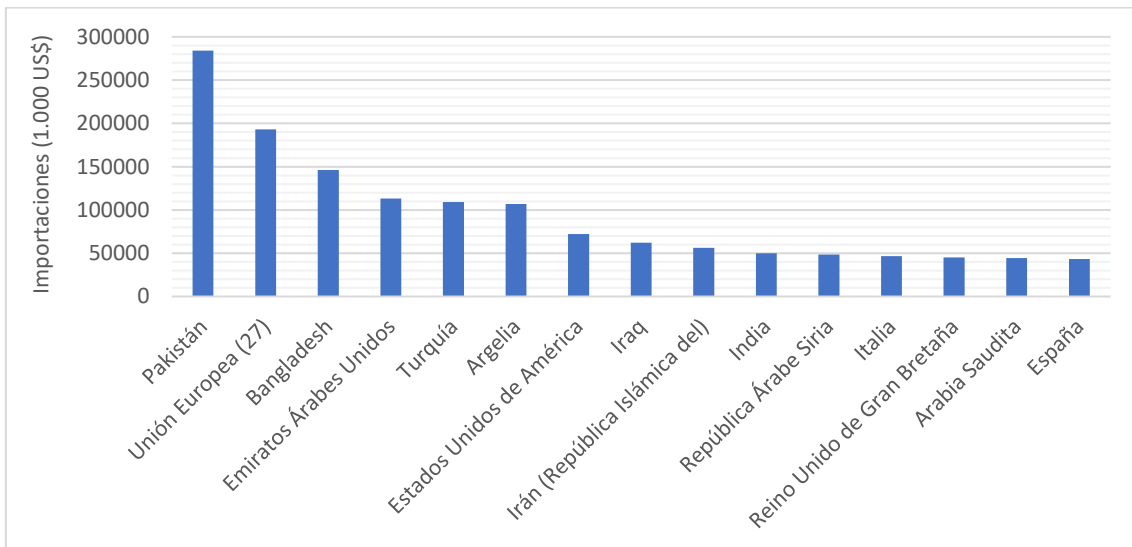


Figura 3. Principales países importadores de garbanzo a nivel global en 2022. Elaboración propia a partir de la fuente: FAO, 2022

A continuación, se analiza en mayor profundidad la situación del cultivo del garbanzo en la UE, basándose en los datos obtenidos de la FAO para el rango de años 2011-2021 (Figura 4). Desde 2011, se observa una tendencia creciente sostenida en la producción hasta el año 2018. Posteriormente, se ha registrado una recuperación y un aumento gradual cada año, alcanzando un pico significativo de más de 91 mil toneladas en 2018, lo que representa el máximo en la década observada. Después de este pico, la producción sufrió una caída destacable en 2019, disminuyendo a 50 mil toneladas nuevamente. La tendencia decreciente continuó levemente en los años siguientes, terminando la serie histórica en un valor de 40 mil toneladas en 2021 (FAO, 2022).

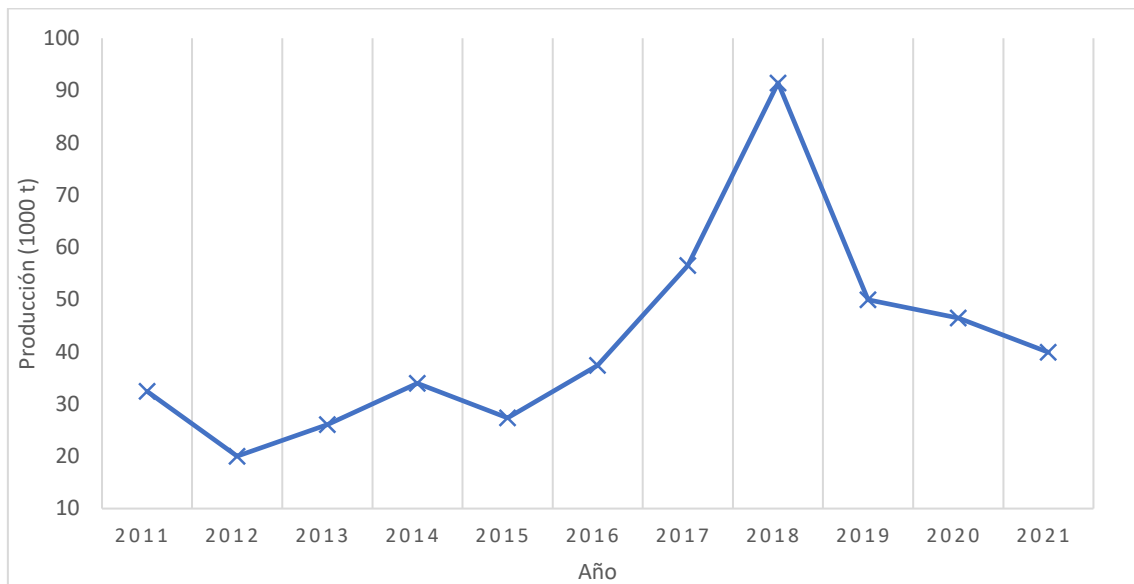


Figura 4. Evolución de la producción de garbanzos en España entre los años 2011 y 2021.
Fuente: MAPA, 2024

España es el principal país productor de garbanzo a nivel europeo, seguido de Italia y de Bulgaria. En 2017 (último año con registros en la FAO) en España se produjeron 56.498 toneladas de garbanzo, es decir, el 39,44% de la producción total de la UE y se cultivó una superficie de 51.856 hectáreas de garbanzo, el 47,57% de la superficie que ocupa dicho cultivo en la UE (Tabla 3) (FAO, 2022). Aunque España destaque como un importante productor de garbanzos en comparación con sus vecinos europeos, tanto la Unión Europea como España no son grandes productores de esta legumbre a nivel mundial, como se ha podido observar anteriormente (Figura 1).

Tabla 3. Producción y superficie cultivada en España y en la UE en 2017. Elaboración propia a partir de la fuente: FAO, 2022.

	España	Unión Europea
Superficie cultivada (ha)	51.856	109.010
Producción (t)	56.498	143.254

El garbanzo es la tercera leguminosa de grano con mayor superficie cultivada en España, únicamente por detrás del guisante y la veza (Tabla 4). A pesar de ello, es la segunda leguminosa a nivel nacional que más producción destina al consumo humano, con 577 toneladas, siendo superado solo por las judías, con 2.539 toneladas (MAPA, 2022).

Tabla 4. Resumen nacional de superficie, rendimiento y producción de leguminosas de grano en el año 2021. Fuente: MAPA, 2022.

Cultivos	Superficie (hectáreas)			Rendimiento (kg/ha)		Producción (toneladas)	
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío	Grano	Paja cosechada
Judías secas en cultivo único	2.419	5.650	8.069	1.474	2.339	16.787	1.646
Judías secas asociadas a maíz	1.169	69	1.238	1.394	1.532	1.734	644
JUDÍAS SECAS TOTAL	3.588	5.719	9.307	1.448	2.330	18.521	2.290
Habas secas para consumo animal	19.209	2.556	21.765	996	1.804	23.751	8.433
Habas secas para consumo humano	63	43	106	1.008	1.628	133	75
HABAS SECAS TOTAL	19.272	2.599	21.871	996	1.801	23.884	8.508
LENTEJAS	33.892	1.449	35.341	854	1.755	31.498	4.563
GARBANZOS	40.038	3.188	43.226	883	1.435	39.914	9.444
Guisantes secos para consumo animal	96.434	18.863	115.297	1.352	2.299	173.710	29.385
Guisantes secos para consumo humano	16	20	36	898	1.335	41	19
GUISANTES SECOS TOTAL	96.450	18.883	115.333	1.351	2.298	173.751	29.404
VEZA	72.161	7.571	79.732	972	1.613	82.371	23.501
ALTRAMUZ	2.460	299	2.759	922	1.500	2.718	76
ALMORTAS	1.239	65	1.304	927	1.455	1.242	122
ALHOLVA	40	18	58	977	1.345	62	1
ALGARROBAS	1.172	53	1.225	760	1.090	949	300
YEROS	41.430	1.759	43.189	1.061	1.891	47.274	6.107
OTRAS LEGUMINOSAS GRANO	7.921	350	8.271	1.110	2.348	9.612	1.588
TOTAL LEGUMINOSAS	319.663	41.953	361.616	-	-	431.796	85.904

A nivel nacional, Castilla y León se sitúa como la segunda comunidad autónoma con mayor producción de garbanzo, generando el 18,84% del total del grano a nivel nacional, lo que equivale a 7.521 t (Tabla 5). Esta cifra la coloca solo por detrás de Andalucía, que lidera con un 57,16%, equivalente a 22.813 t de grano (MAPA, 2022). Es importante destacar que estas dos comunidades autónomas, en conjunto, representan el 76% de la producción total de garbanzos en España, lo que subraya la gran relevancia que tiene cultivo del garbanzo en ambas regiones.

Tabla 5. Análisis de superficie, rendimiento y producción de garbanzo en 2021 por CCAA. Elaboración propia a partir de la fuente: MAPA, 2022.

Provincias y CCAA	Superficie (ha)			Rendimiento (kg/ha)		Producción de grano (t)	Producción de paja (t)
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío		
GALICIA	14	3	17	1.095	1.025	19	–
P. DE ASTURIAS	–	–	–	–	–	–	–
CANTABRIA	–	–	–	–	–	–	–
PAÍS VASCO	80	–	80	2.975	–	238	–
NAVARRA	35	20	55	586	1.415	49	–
LA RIOJA	11	9	20	1.300	1.700	30	8
ARAGÓN	33	12	45	798	2.083	51	6
CATALUÑA	354	32	386	817	1.463	336	52
BALEARES	280	–	280	660	–	185	129
CASTILLA Y LEÓN	7949	575	8524	868	1.072	7521	1724
MADRID	1502	131	1633	708	1.387	1245	1074
CASTILLA-LA MANCHA	3790	232	4022	989	1.322	4058	338
C. VALENCIANA	3	–	3	560	–	2	–
R. DE MURCIA	33	23	56	893	1.998	75	13
EXTREMADURA	2642	100	2742	1.193	1.297	3282	–
ANDALUCÍA	23298	2050	25348	843	1.548	22813	6100
CANARIAS	14	1	15	659	1.000	10	–
ESPAÑA	40.038	3.188	43.226	14.944	17.310	39.914	9.444

En Castilla y León hay tres provincias que destacan en la producción de garbanzo: Valladolid, Zamora y Salamanca, con producciones de grano de 2.273 t, 1.629 t y 1.565 t, respectivamente (Tabla 6). Estas provincias en conjunto producen el 5.467 t de grano, lo que se corresponde al 72,7% de la producción de su comunidad autónoma (MAPA, 2022).

Tabla 6. Análisis de superficie, rendimiento y producción de garbanzo en las provincias de Castilla y León en 2021. Elaboración propia a partir de la fuente: MAPA, 2022.

Provincias y CCAA	Superficie (ha)			Rendimiento (kg/ha)		Producción de grano (t)	Producción de paja (t)
	Secano	Regadío	Total	Secano	Regadío		
Ávila	176	–	176	610	–	107	13
Burgos	265	22	287	1.200	1.800	358	107
León	404	69	473	750	1.500	407	142
Palencia	501	20	521	1.500	2.000	792	–
Salamanca	1.744	154	1.898	800	1.100	1.565	626
Segovia	362	30	392	800	1.300	329	165
Soria	97	2	99	600	1.200	61	–
Valladolid	2.525	–	2.525	900	–	2.273	182
Zamora	1.875	278	2.153	750	800	1.629	489
CASTILLA Y LEÓN	7.949	575	8.524	868	1.072	7.521	1.724

2.2.3. El garbanzo de Fuentesauco (IGP)

El garbanzo de Fuentesauco es una Indicación Geográfica Protegida (en adelante IGP) concedida en el año 1996 a la legumbre de la especie *Cicer arietinum* var. *macrocarpum* producida en la comarca de la Guareña, según refleja el Reglamento de la Unión Europea (CE) No 510/2006 «Garbanzo de Fuentesauco». La comarca de la Guareña está situada al sureste de la provincia de Zamora, en la comunidad autónoma de Castilla y León, España. La IGP es un sello distintivo que reconoce la gran calidad organoléptica de esta legumbre y vincula inseparablemente su producción a las características geográficas y culturales de la región (CE 510/2006) (Figura 5).



Figura 5. Logotipo de la IGP garbanzo de Fuentesauco. Fuente: MAPA, 2021

El garbanzo de Fuentesauco es un tipo de garbanzo caracterizado por estar adaptado a las condiciones del lugar en el que vive, presentando diferencias morfológicas y fisiológicas en su desarrollo debidas al medio. Precisamente por ello, recibe como sobrenombre el de la zona geográfica donde se cultivan. Es un cultivo poco productivo, pero sin grandes requerimientos nutricionales e hídricos. Por otro lado, presenta una elevada calidad de producto, caracterizada por su tamaño, textura y sabor (Junta de Castilla y León, 2019).

2.3. La rabia del garbanzo

La rabia del garbanzo es una enfermedad fúngica que supone la principal limitación para la producción de garbanzos en todo el mundo (Gan et al., 2006). Esta enfermedad es causada por el hongo *Didymella rabiei* (en su forma teleomórfica o sexual) o *Ascochyta rabiei* (en su forma anamórfica o asexual). *A. rabiei* es un hongo ascomiceto perteneciente a la familia Didymellaceae. La enfermedad que produce se manifiesta en todas las partes aéreas de la planta, causando lesiones necróticas que son circulares en los folíolos y las vainas y alargadas e irregulares en los tallos y peciolo (Bayraktar et al., 2007). La destrucción del tejido del huésped por parte de *A. rabiei* provoca el eventual fallecimiento de las plantas de garbanzo, lo que resulta en pérdidas significativas en la producción agrícola. Además, la presencia del hongo en el tejido muerto también puede contaminar las semillas de garbanzo, lo que compromete a la viabilidad de la cosecha futura (Singh et al., 2022). Se han registrado experiencias en diversos países de pérdidas totales del cultivo como consecuencia de la infección de *A. rabiei* (De Rossi et al., 2018).

El ciclo de vida del hongo *A. rabiei* (Figura 6), se inicia con la dispersión de conidios a través del aire (i), los cuales alcanzan y se adhieren a la superficie de las hojas de las plantas de garbanzo (ii). Estos conidios germinan y forman apresorios (iii), facilitando la penetración a través de la capa epidérmica y la invasión de los tejidos subepidérmicos de la planta (iv). Posteriormente, se desarrollan picnidios que contienen esporas conidiales asexuales, las cuales se dispersan mediante salpicaduras de lluvia (vi). Durante el ciclo sexual, en condiciones húmedas y frescas (invierno, 5-10°C), se forma en la planta infectada una estructura especializada llamada pseudotecio, una estructura en forma de copa con una capa fértil interior llamada himenio y una apertura estrecha exterior llamada

ostiolo (vii). Dentro del himenio, se producen ascas, que contienen ocho ascosporas cada una (viii). En primavera, el pseudotecio libera con fuerza las ascosporas, las cuales son dispersadas por el viento a distancias considerables, hasta 10 km, propagando así la infección a nuevas áreas (ix).

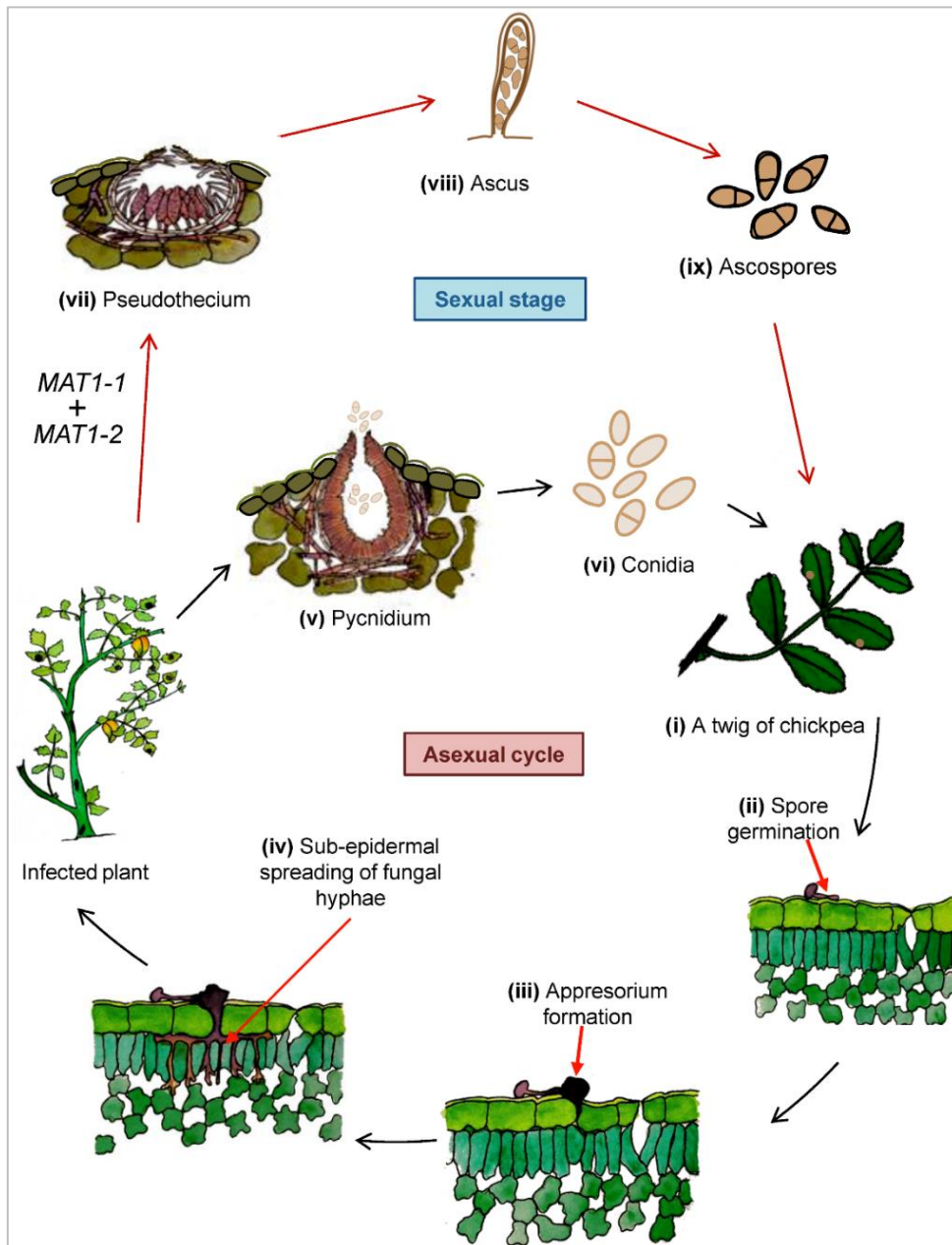


Figura 6. Ciclo de vida de *A. rabiei* y *D. rabiei*: etapas asexual y sexual en el ciclo de vida. Fuente: (Singh et al., 2022).

En términos de control, los cultivares actuales ofrecen una resistencia parcial a *A. rabiei*, que puede disminuir rápidamente debido a la variabilidad del patógeno, impulsada por su capacidad de recombinación sexual. Para el control de la enfermedad se debe desarrollar un manejo integrado, combinando las siguientes opciones agronómicas (Gan et al., 2006):

- El uso de semillas libres de *A. rabiei* y el tratamiento de semillas con fungicidas eficaces reduce la probabilidad de transmitir enfermedades transmitidas por las semillas a las plántulas.
- Enterrar profundamente el rastrojo de garbanzo minimiza el inóculo transmitido por el rastrojo.
- Se requieren uno o dos años de cultivos no hospedantes para áreas cálidas y húmedas y una rotación de cultivos de 3 a 4 años para áreas frías y secas, para reducir los niveles de inóculo transmitido por rastrojos.
- La siembra de garbanzos a una distancia considerable de los cultivos previos ayudará a reducir la densidad de ascosporas en el aire liberadas por los desechos infectados.
- Se debe considerar la fecha óptima de siembra, ya que puede determinar si los cultivos están expuestos a condiciones propicias o desfavorables para la proliferación del hongo. La siembra profunda también es beneficiosa, ya que enterrar las semillas a mayor profundidad puede protegerlas de la infección. Además, la optimización de la densidad de las plantas favorece una mejor circulación del aire, reduciendo la humedad y disminuyendo las posibilidades de propagación del hongo.
- Una nutrición equilibrada es esencial para fortalecer la resistencia de las plantas a la rabia, proporcionando los nutrientes necesarios para mantener su salud y capacidad de defensa.
- Adoptar un enfoque integrado que combine todas las opciones agronómicas, incluida la selección de cultivares, es de vital importancia para controlar esta enfermedad de forma económica y eficaz.

2.4. *Trichoderma*

2.4.1. Taxonomía y biología

Trichoderma es un género de hongos filamentosos anamórficos pertenecientes a la familia Hypocreaceae (Figura 7). La reproducción de estos hongos es asexual (en su forma anamórfica: *Trichoderma*) y sexual (en su forma teleomórfica: *Hypocrea*). Producen tres tipos de propágulos: hifas, conidios y clamidosporas, estas últimas son estructuras globosas con pared rugosa y más gruesa que la de los conidios, con capacidad de resistencia a las condiciones ambientales desfavorables (Martínez et al., 2013).

Dominio: Eukaryota
Reino: Fungi
División: Ascomycota
Subdivisión: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Orden: Hypocreales
Familia: Hypocreaceae
Género: <i>Trichoderma</i>

Figura 7. Taxonomía del género *Trichoderma*. Elaboración propia a partir de la fuente: Tyškiewicz et al., 2022

Los hongos de este género se desarrollan en una gran variedad de sustratos y bajo un amplio intervalo de temperaturas, aunque muestran preferencia por los suelos ligeramente ácidos y ricos en materia orgánica (Klein & Eveleigh, 2002). El desarrollo de *Trichoderma* se activa con la presencia de humedad, con óptimo de 60% de la capacidad de retención de humedad del suelo. A porcentajes mayores de saturación, la colonización y supervivencia disminuyen, por baja disponibilidad de oxígeno (Martínez et al., 2013).

2.4.2. Mecanismos de acción

Las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de estimular el crecimiento y desarrollo de las raíces laterales en las plantas (Pelagio-Flores et al., 2017), lo que lleva a un aumento en la productividad de los cultivos (Harman, 2006). Aislados de estas especies han mostrado la capacidad de generar más de 70 metabolitos, incluyendo compuestos que

fomentan el crecimiento y desarrollo vegetal. Estos microorganismos pueden liberar compuestos de tipo hormonal y diversos ácidos orgánicos que reducen el pH del suelo (Singh et al., 2016 ; Youssef et al., 2016). También son capaces de solubilizar fosfatos y otros nutrientes esenciales, lo que mejora el desarrollo de las plantas (Companiononi et al., 2019).

Trichoderma también es utilizado como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos, debido a sus múltiples mecanismos de acción (Hernández-Melchor et al., 2019). Las principales enfermedades de las plantas se han manejado con éxito gracias a su aplicación y, actualmente, más del 60% de los biofungicidas presentes en el mercado se derivan de especies de *Trichoderma* (Manzar et al., 2022).

Los mecanismos de acción de *Trichoderma* como agente de biocontrol incluyen la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo, la antibiosis y la resistencia inducida de las plantas (Manzar et al., 2022). Las especies de *Trichoderma* crecen rápidamente y son competidores agresivos frente a otros hongos, ya que colonizan velozmente los sustratos y desplazan a los patógenos, de crecimiento más lento (Oszust et al., 2020). El micoparasitismo es el tipo de interacción en la que un hongo parásito se beneficia de otro, el huésped, del que obtiene los nutrientes necesarios para completar su crecimiento y reproducción, pudiéndole causar perjuicio o incluso la muerte (Poveda, 2018). Por otro lado, la antibiosis se define como la supresión de un organismo vivo por varios metabolitos producidos por otro organismo (Kumar et al., 2023). Otro mecanismo de acción de *Trichoderma* es la inducción de tolerancia a estreses abióticos y la resistencia vegetal (local y sistémica) frente a estreses bióticos.

El inicio de la resistencia sistémica requiere que las cepas de *Trichoderma* colonicen eficientemente la raíz de la planta huésped. La colonización de las plantas por *Trichoderma* provoca cambios a nivel del transcriptoma y proteoma, lo que resulta en alteraciones significativas en el metabolismo de la planta (Verma et al., 2007). La interacción física entre *Trichoderma* y la planta se limita a las capas celulares externas, donde las hifas de *Trichoderma* colonizan el córtex de la raíz, sin alcanzar los haces vasculares. Cuando *Trichoderma* coloniza las raíces de la planta, inicia la producción de

moléculas señalizadoras que activan defensas locales y generan señales transmitidas a través del sistema vascular a otras partes de la planta, induciendo respuestas defensivas en tejidos distantes (Gupta & Bar, 2020). Este proceso, conocido como resistencia sistémica inducida, depende principalmente de la señalización de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). *Trichoderma* promueve la síntesis de JA y ET que, al activar defensas locales, también envían señales a otras partes de la planta (Chakraborty et al., 2020). Esto induce la expresión de genes clave en la síntesis de compuestos de defensa, como fitoalexinas y compuestos fenólicos. Aunque el ácido salicílico (SA) tiene un papel menor en este proceso, puede complementar la respuesta defensiva (Pacheco-Trejo et al., 2022). Así, *Trichoderma* no solo refuerza la resistencia contra patógenos locales, sino que también mejora la defensa sistémica, preparando a la planta para responder rápidamente a futuros ataques mediante la pre-activación de genes defensivos (Gupta & Bar, 2020).

2.4.3. Formulación y aplicación de *Trichoderma*

Trichoderma se produce en formulaciones sólidas y líquidas con inóculo viable (hifas, clamidosporas y conidios) para usarlo como agente de biocontrol (Cumagun, 2014; Hernández-Melchor et al., 2019). Ambas formulaciones requieren el secado para obtener un producto estable y con una vida prolongada; así, el secado por aspersión es el más utilizado a escala industrial, por su bajo costo y eficiencia (Morgan et al., 2006). La mayoría de estos bioformulados se preparan a base de las especies *T. viride*, *T. virens* y, en mayor medida, *T. harzianum* (Vargas-Hoyos & Gilchrist, 2015).

Algunas formulaciones comerciales de este microorganismo corresponden a talcos, vermiculita-salvado de trigo, gránulos de pesta (masa cohesiva hecha de harina de trigo, rellenos y otros aditivos que contienen al hongo), cáscara de café y aceite vegetal o mineral (Kumar et al., 2014). El 67% de estas formulaciones están compuestas por una única especie de *Trichoderma*, mientras que el resto son combinaciones de dos o más especies de este género o mezclas con especies de hongos micorrícicos, bacterias u otros compuestos biológicos (Hernández-Melchor et al., 2019).

2.4.4. Importancia agrícola y mercado

Trichoderma se encuentra entre los agentes de control biológico más efectivos en la agricultura, constituyendo más del 60% de los biofungicidas registrados a nivel mundial. Este microorganismo se comercializa en varias formas, incluyendo bioplaguicidas, biofertilizantes, estimulantes del crecimiento y rendimiento de las plantas, y como agente que solubiliza nutrientes en campos agrícolas o que descompone materia orgánica (Vinale et al., 2008; Charoenrak & Chiradej, 2016; Hernández-Melchor et al., 2019).

India es el principal distribuidor mundial de productos que utilizan especies certificadas de *Trichoderma*, como *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. gamsii*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. virens* y *T. viride*. Otros países que también tienen una producción significativa de este microorganismo son Bélgica, Chipre, Francia, Italia, España, Suecia, Eslovenia, Reino Unido, Turquía y Estados Unidos (Hernández-Melchor et al., 2019).

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo se justifica en la necesidad de desarrollar estrategias de manejo integrado de enfermedades que sean menos dependientes de insumos químicos, en línea con los principios de la agricultura sostenible y la protección ambiental. En este contexto, la optimización de las prácticas de aplicación de *Trichoderma* podría ofrecer una solución sostenible y eficaz para el manejo de la rabia del garbanzo, teniendo un impacto positivo en la rentabilidad de los cultivos y contribuyendo a la seguridad alimentaria.

La hipótesis de este trabajo de investigación es que la aplicación de *Trichoderma* spp. sobre las semillas de garbanzo antes de su siembra ejerce un efecto supresor significativo sobre la rabia del garbanzo, causada por *A. rabiei*. Este efecto sería consecuencia de la capacidad de *Trichoderma* de colonizar las raíces de las plantas de garbanzo, activando una resistencia sistémica en las plantas frente a *A. rabiei*.

El objetivo principal de este estudio es analizar la eficacia del hongo beneficioso *Trichoderma* como agente de control biológico contra la enfermedad causada por el patógeno *A. rabiei* en garbanzo de Fuentesauco. A partir de este objetivo, se plantean diferentes objetivos específicos:

1. Evaluar y comparar la eficacia de diversas especies de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* como agentes de control biológico frente a *A. rabiei* de forma directa e indirecta.
2. Analizar el efecto de diferentes recubrimientos sobre la germinación de conidios de *Trichoderma* y semillas de garbanzo de Fuentesauco.
3. Comprobar la eficacia de la aplicación de *Trichoderma* mediante recubrimientos para el control biológico de la rabia del garbanzo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material fúngico utilizado

Los organismos utilizados fueron 5 especies distintas del género *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. citrinoviride* y *T. atroviride*) y el hongo patógeno *A. rabiei* (Figura 8). Los hongos se conservaron en placas Petri con medio de cultivo PDA, realizando subcultivos periódicos, cada 2-4 semanas, transfiriendo una porción del hongo a una nueva placa con medio fresco para evitar la senescencia y mantener la viabilidad y pureza del cultivo a lo largo del tiempo.

El hongo *A. rabiei* (cepa P1ENE/19): fue facilitado amablemente por el Dr. Diego Rubiales, del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC, el cual fue aislado de campos de cultivo de garbanzo en Alemania.

Los hongos *T. asperellum* (ITL), *T. citrinoviridae* (EN2), *T. atroviridae* (HP151) y *T. harzianum* (EN1) se obtuvieron de la colección interna del GIR Patología Forestal de la Universidad de Valladolid, aislados de diferentes especies forestales.

El hongo *T. hamatum* (MBG) fue facilitado amablemente por el Dr. Pablo Velasco de la Misión Biológica de Galicia del CSIC, aislado de raíces de berza en parcelas experimentales de la provincia de Pontevedra.

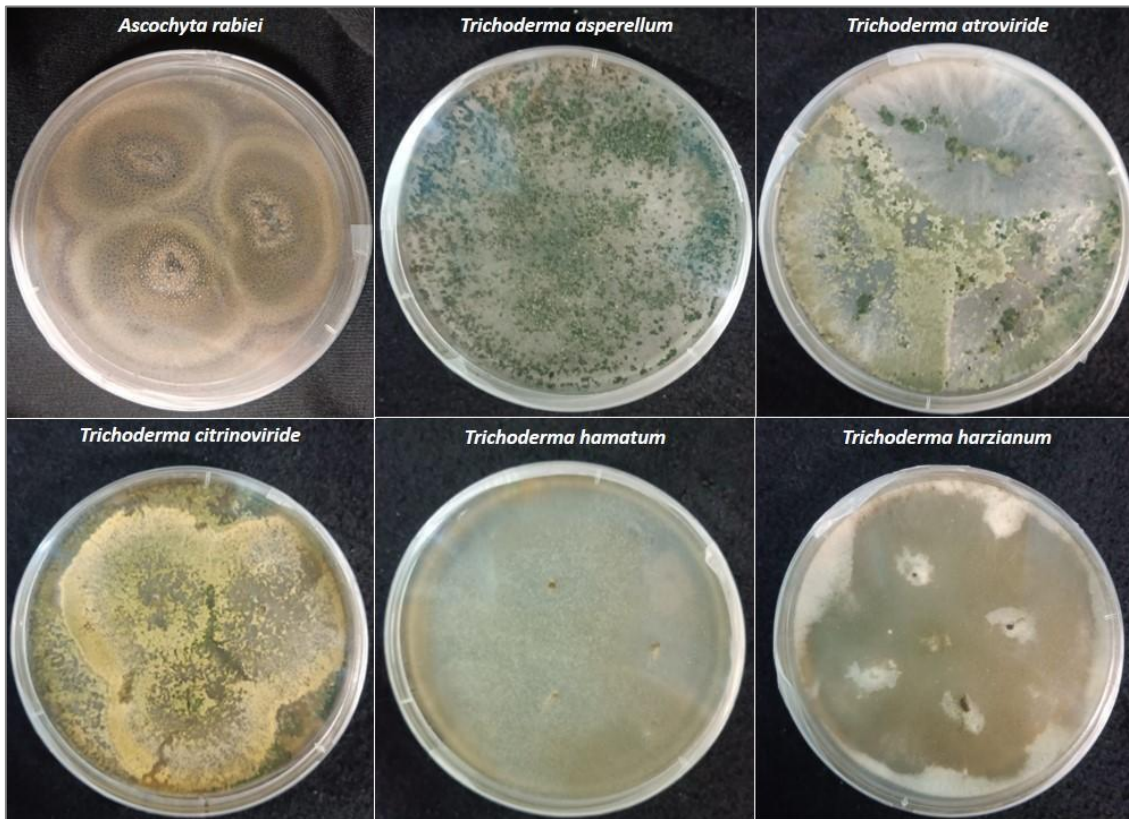


Figura 8. Placas Petri colonizadas por los organismos utilizados para la realización de los ensayos. Fuente: elaboración propia.

Se han utilizado también garbanzos, semillas certificadas R1 *C. arietinum* var. cuaiz, con una pureza mínima del 98% y una germinación mínima del 80%, cedidas amablemente por el Consejo Regulador de la Indicación Geográfica Protegida “Garbanzo de Fuentesauco”. El número de lote de las semillas utilizadas es ES-08-37-0081-23CUAI5102 y fue precintado en febrero del 2023.

4.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para la realización de los ensayos *in vitro* fueron PDA (Potato Dextrose Agar) y CSMDA (Chickpea Seed Meal Dextrose Agar). Las composiciones de los medios de cultivo sólidos distribuidos en las placas Petri fueron las siguientes:

- PDA: se suspendieron 39 g en 1 L de agua destilada. Suministrado por Scharlab (Barcelona, España).

- CSMDA: se suspendieron 40 g de harina de garbanzo de ADPAN (Asturias, España), 20 g de dextrosa de Becton, Dickinson (BD) (Madrid, España) y 20 g de agar de Biomedics (Madrid, España) en 1 L de agua destilada.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave 30 minutos a 120°C, después, en una cabina de flujo laminar, se vertieron en placas Petri hasta su solidificación. De esta forma, se obtuvieron placas con medio de cultivo estéril.

4.3. Ensayo de antagonismos *in vitro*

Este ensayo tiene como objetivo evaluar la eficacia de diferentes especies de *Trichoderma* en la inhibición del crecimiento de *A. rabiei* en placas de Petri.

4.3.1. Procedimiento experimental

Para la realización de este ensayo se extrajo un disco de agar de 5x5 mm de una placa Petri colonizada por el hongo patógeno y se depositó en la parte central izquierda de una placa Petri con medio de cultivo estéril, a dos centímetros del borde de la placa.

Debido a la diferencia de velocidad de crecimiento entre los hongos de estudio (antagonista y patógeno), el patógeno se desarrolló durante 48 h en ausencia de otros organismos y, pasado este tiempo, se añadió a la placa un disco de igual tamaño de una placa colonizada por completo por *Trichoderma*, en este caso en la parte central derecha, a dos centímetros del borde (Figura 9).

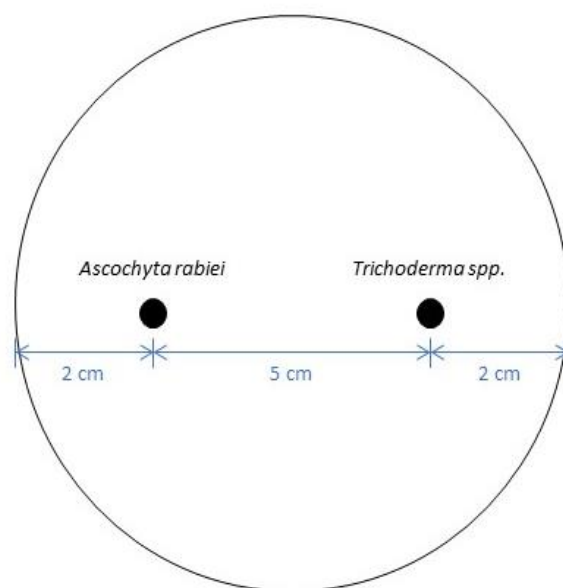


Figura 9. Representación de la disposición de la placa Petri para la realización del ensayo de antagonismos in planta (vista en planta).

Tras 48 horas de añadirse los discos de *Trichoderma* se sacaron fotografías a la parte posterior de cada placa (Figura 10), repitiéndose el proceso cada 24 horas, hasta que fueron colonizadas por completo.

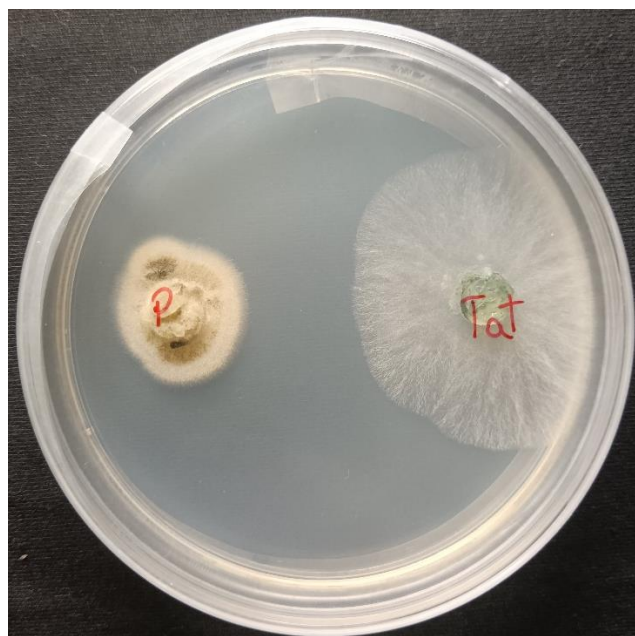


Figura 10. Estado de una de las placas del ensayo a las 48 horas de añadir *Trichoderma* (*A. rabiei* en la parte izquierda de la placa; *Trichoderma atroviride* en la parte derecha).

En cada ensayo se pusieron 5 placas Petri por cada especie de *Trichoderma* y otras 5 placas de control, en las que se puso únicamente el disco del hongo patógeno y se desarrolló en ausencia de otro organismo. El ensayo se realizó dos veces para cada medio de cultivo, PDA y CSMDA.

4.3.2. Análisis de imagen

Finalmente, se analizaron todas las fotografías con el programa ImageJ, desarrollado por Wayne Rasband en el U.S. National Institutes of Health (NIH), para obtener el área colonizada por el hongo patógeno en cada momento. En primer lugar, se determinó una escala para cada imagen con una distancia real conocida, como es el diámetro de la placa Petri (90 mm). Posteriormente, se seleccionó la opción *Freehand selection* (selección a mano alzada) y se trazó el área colonizada por el patógeno, para conocer el valor del área que ocupa el patógeno (Figura 11).

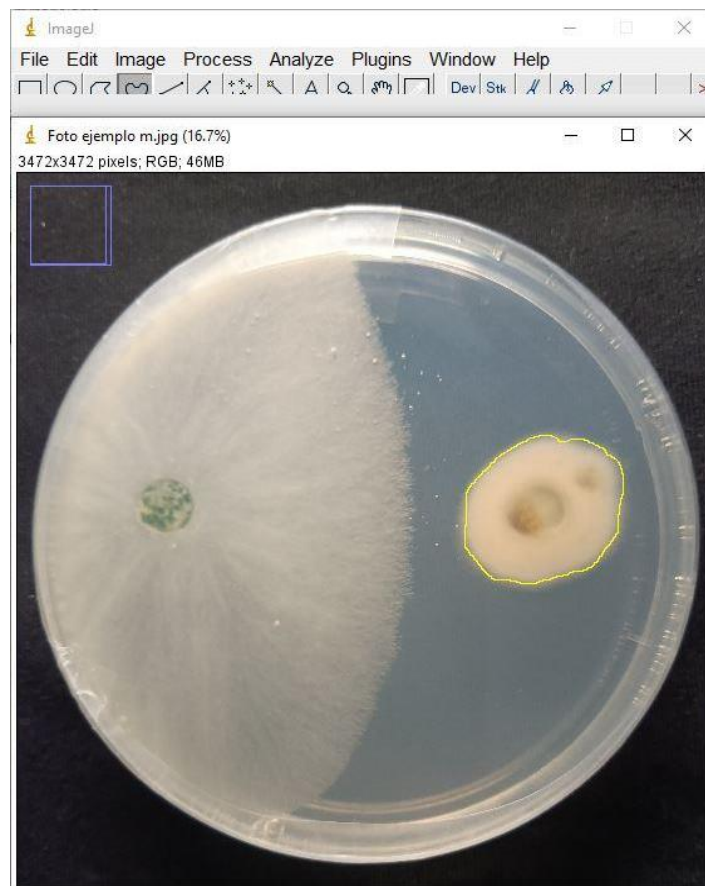


Figura 11. Medición de la superficie de la placa colonizada por el hongo patógeno.

4.4. Ensayo *in planta* con inoculación radicular de *Trichoderma*

El objetivo del presente ensayo es evaluar la influencia de la inoculación radicular de 5 especies diferentes de *Trichoderma* en la supervivencia de las plantas y en los daños provocados por *A. rabiei*.

4.4.1. Siembra

Para llevar a cabo este ensayo, se empleó un sustrato compuesto por una mezcla de suelo y perlita en una relación volumétrica 2:1 (2 partes de suelo por 1 parte de perlita). El suelo se recogió en el municipio de Fuentesauco, con el propósito de replicar las condiciones de cultivo similares a las de la zona de estudio. Fuentesauco es un municipio situado al sureste de la provincia de Zamora (Castilla y León, España). Las coordenadas geográficas de la parcela en la que se recogió la tierra son las siguientes: 41° 13' 45.7" N, 5° 29' 48.2" W. Este suelo fue sometido a un análisis detallado por parte del Centro Tecnológico Agrario y Alimentario ITAGRA (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis fisicoquímico del suelo utilizado en todos los experimentos *in planta*.

Parámetros	Resultados	Métodos
pH	6.87 ± 0.11	Potenciometría PNT-S-01
Conductividad	0.06 mS/cm	Medidor de conductividad (1:5)
Arena	63.56 g/100g	Densímetro de Bouyoucos
Limo	10.28 g/100g	Densímetro de Bouyoucos
Arcilla	26.16 g/100 g	Densímetro de Bouyoucos
Textura	Franco arcilloso-arenoso	-
Materia orgánica oxidable	0.84 g/100g	Redox volumetry PNT-S-05
Carbonatos	Indetectable	Bernard PNT-S-03
Caliza activa	Indetectable	Bernard
P asimilable	40.5 ± 4.4 mg/Kg	Olsen PNT-S-04
K asimilable	273 ± 22 mg/Kg	ICP-OES PNT-S-07
Ca asimilable	12.4 ± 2.9 meq/100g	ICP-OES PNT-S-06
Mg asimilable	3.2 meq/100g	ICP-OES PNT-S-06
Na asimilable	0.03 meq/100g	ICP-OES PNT-S-07

El sustrato se esterilizó en autoclave mediante dos ciclos de 30 minutos a 120°C, espaciados entre sí por 48 horas, con el objetivo de evitar la supervivencia de cualquier tipo de organismo presente en el sustrato.

Previamente a la realización de la siembra se aseguró la desinfección completa de todo el equipo y material utilizado en el proceso. Para ello, se sumergieron las macetas, las pinzas y cualquier otro instrumento utilizado en etanol al 70%, un desinfectante efectivo que garantiza la eliminación de posibles patógenos y microorganismos que podrían afectar al desarrollo de las plantas.

Una vez desinfectado el material, se llenaron macetas de 500 ml de volumen con el sustrato mencionado anteriormente. Posteriormente, se realizó la siembra de las semillas de garbanzo, colocándolas en el sustrato a una profundidad de aproximadamente 1 cm, utilizando pinzas esterilizadas para evitar la contaminación cruzada y asegurar una siembra precisa.

En el presente ensayo se utilizaron 15 plántulas para cada uno de los seis tratamientos que se diseñaron. Estos tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera:

- Cinco tratamientos en los que las plantas fueron inoculadas con una especie diferente de *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. citrinoviride* y *T. atroviride*), junto con una inoculación en la parte aérea del patógeno.
- El sexto tratamiento se estableció como grupo de control. En este tratamiento, las plantas únicamente fueron inoculadas con el patógeno, sin recibir ninguna inoculación de *Trichoderma*.

4.4.2. Inoculación de *Trichoderma*

La inoculación de *Trichoderma* se realizó 7 días después de haber sembrado los garbanzos. Para ello, se obtuvieron las esporas de placas germinadas por las distintas especies, echando 5 ml de agua destilada estéril sobre las placas y friccionando por completo las placas con la punta de la pipeta. Posteriormente se vertió el líquido obtenido

a un tubo Falcon haciéndolo pasar por el filtro de esporas Miracloth de Millipore (USA), que impide el paso del micelio y permite el paso del agua destilada y las esporas en suspensión.

Para conocer la concentración de esporas que tiene el líquido resultante, éste se diluyó en un tubo Eppendorf a una concentración 1:100 con agua destilada estéril y se depositaron 100 µl de la dilución en una cámara de Neubauer cubriendo el líquido con un cubreobjetos. Se realizó el conteo de esporas y se aplicó la siguiente fórmula para conocer la concentración de esporas de la muestra:

$$\text{Esporas/mL} = \chi \times 25 \times 10^4 \times 10^2$$

Siendo χ la media aritmética de las esporas contadas en cada cuadrante, y 10^2 el factor de dilución.

Conocida la concentración de esporas de las suspensiones obtenidas, se diluyeron hasta obtener una concentración de $2 \cdot 10^7$ esporas/ml y se aplicó 1 ml de dicha dilución a cada maceta. El agua destilada estéril con las esporas en suspensión se aplicó con una pipeta, introduciéndola con un ángulo de 45° a una profundidad de aproximadamente 2 cm, procurando soltar las esporas lo más cerca posible de la raíz principal.

4.4.3. Inoculación del patógeno

El hongo patógeno (*A. rabiei*) se inoculó a los 14 días tras la siembra, 7 días después de inocular *Trichoderma*. Para obtener las esporas y conocer la concentración se utilizó el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. En este caso, las plantas se inocularon por pulverización con una suspensión concentración $5 \cdot 10^5$ esporas/ml, siguiendo la metodología descrita por Pande et al. (2011). Tras la inoculación, las plántulas se secaron parcialmente al aire durante 30 minutos para evitar el desprendimiento de las esporas. Posteriormente, se cubrieron con bolsas de plástico durante una semana, con la finalidad de mantener la humedad y asegurar la instalación del hongo (Figura 12).



Figura 12. Ejemplo de una de las bandejas del ensayo, tapadas tras la inoculación del hongo patógeno.

4.4.4. Toma de datos

La toma de datos comenzó a realizarse 15 días tras la inoculación del patógeno. Se estableció una escala de daños para evaluar el estado de las plantas en cada medición (Figura 13):

1. La planta no presenta síntomas visibles.
2. La planta presenta síntomas observables en las hojas (manchas necróticas).
3. La planta presenta síntomas observables en el tallo y/o comienza la defoliación.
4. Rotura del tallo debido a la estrangulación causada por la mancha necrótica.

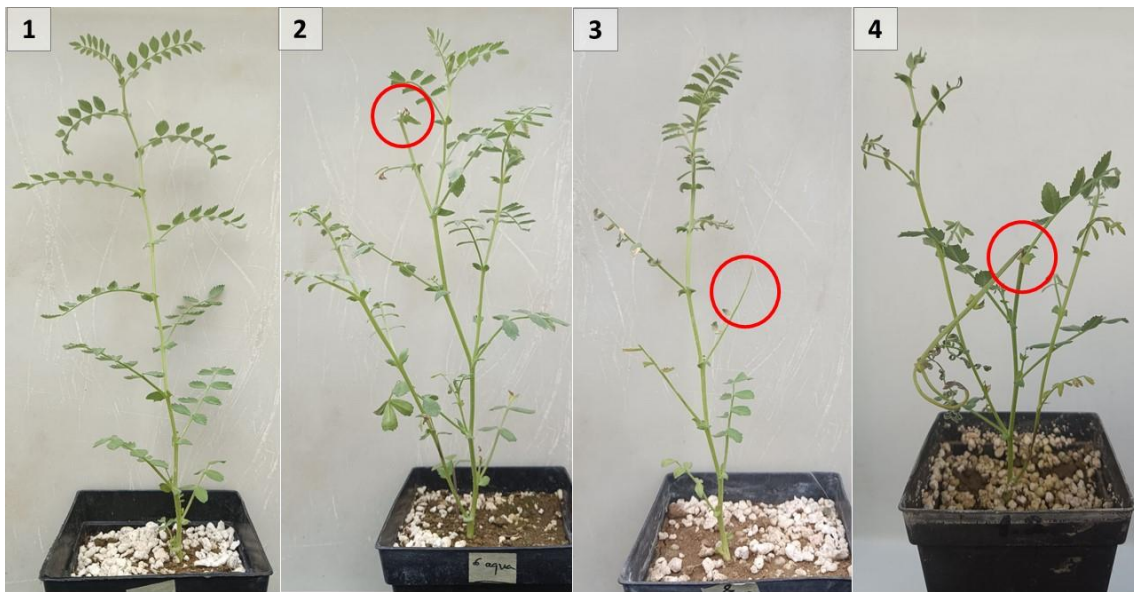


Figura 13. Ejemplo de plantas que corresponden a cada grupo de la escala de daños. Fotografías tomadas 15 días después de la inoculación de *A. rabiei*.

Se realizaron mediciones continuas hasta que todas las plantas del control alcanzaron un valor de 4 en la escala, indicativo de su muerte, momento en el cual se consideró finalizado el ensayo.

4.5. Ensayo de compatibilidad de esporas de *T. harzianum* con los recubrimientos

En el presente ensayo se pretendió evaluar la influencia de diferentes recubrimientos en la germinación de esporas de *T. harzianum*, con el fin de determinar si los recubrimientos son o no compatibles con los conidios.

4.5.1. Material utilizado

Tras la evaluación de los resultados obtenidos con la metodología del apartado 4.4, se seleccionó *T. harzianum* para llevar a cabo este ensayo y los subsiguientes.

Los productos con los que se realizaron los distintos recubrimientos utilizados fueron los siguientes: almidón pregelatinizado (PS) de Biosynth (Reino Unido), carboximetilcelulosa (CMC) de SaporePuro (Italia), goma arábica (GA) de SaporePuro (Italia) y alginato de sodio (NaA) de SaporePuro (Italia).

4.5.2. Procedimiento experimental

En tubos Eppendorf estériles, se añadió 1 ml de cada uno de los distintos recubrimientos, que consistieron en disoluciones de 1, 3, 5 y 7 % peso/volumen de los productos mencionados en el apartado anterior en agua destilada. Todos los productos utilizados fueron autoclavados previo a su utilización. Posteriormente, con pipetas estériles se introdujeron en todos los tubos 10^6 conidios de *T. harzianum* y se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm y 22°C. A las 12 y 24 horas después de la inoculación, se realizaron conteos de esporas germinadas: se depositaron 100 µl de cada muestra en cámaras de Neubauer y se cuantificó el porcentaje de esporas germinadas. Este procedimiento se repitió cuatro veces para cada recubrimiento.

4.6. Ensayo de compatibilidad de las semillas con los recubrimientos

Este ensayo se llevó a cabo para evaluar el efecto de los diferentes recubrimientos sobre la germinación de semillas de garbanzo, con el fin de identificar recubrimientos que promuevan o inhiban su proceso de germinación.

4.6.1. Material utilizado

El material utilizado para la realización de este ensayo fueron garbanzos de Fuentesauco y los distintos tipos de recubrimientos mencionados anteriormente, a excepción de CMC, que fue descartado al observar que inhibía totalmente la germinación de los conidios de *T. harzianum* tras la realización del ensayo descrito en el apartado 4.5.

4.6.2. Procedimiento experimental

Se pesaron 50 g de semillas y se introdujeron en una bolsa con 2,5 ml de cada uno de los recubrimientos (los mismos que en el apartado 4.5.1). Las bolsas fueron agitadas homogéneamente hasta que los recubrimientos cubrieron por completo la superficie de las semillas (2-3 min). Por último, las semillas se dejaron secando en una cabina de flujo laminar durante 2 horas en placas Petri abiertas a una temperatura de 25°C.

Una vez recubiertas las semillas, se depositaron diez de ellas sobre una placa Petri con un papel de filtro estéril. Este papel había sido previamente humedecido con agua destilada estéril para favorecer la germinación, ya que la humedad activa los mecanismos bioquímicos de germinación de las semillas. Las placas Petri se llevaron a una cámara de cultivo modelo IGCS 900 HR LED (Ibercex, España), con una temperatura de 22°C, una humedad relativa del 80% y un fotoperiodo de 18 h de luz y 6 h de oscuridad. En cada ensayo se pusieron 4 placas Petri por cada recubrimiento, es decir, un total de 40 semillas por recubrimiento.

Trascurridos 5 y 8 días desde el recubrimiento se realizaron conteos, observando si las semillas germinaron y, en caso de haberlo hecho, se midió la longitud de la radícula y la plúmula de las plántulas (Figura 14).



Figura 14. Ejemplo de una de las placas del ensayo a los 5 días de aplicar los recubrimientos.

4.7. Ensayo *in planta* con el recubrimiento GA 1% y *T. harzianum*

Este ensayo evalúa el efecto de la inoculación de *T. harzianum* con el recubrimiento GA al 1% en la supervivencia de las plantas y la reducción de daños causados por *A. rabiei*. El sustrato utilizado fue el mismo que el descrito en el apartado 4.4.1, en este caso sin esterilizar, simulando condiciones similares a las de campo. Esto permite conocer el impacto de *T. harzianum* en la supervivencia de las plantas y su protección contra *A. rabiei* en un contexto similar al agrícola.

4.7.1. Material utilizado

El presente ensayo, y los que le siguen, se realizaron habiendo escogido un único tipo de recubrimiento, tras analizar los resultados de los ensayos anteriores (GA al 1%) y una única especie de *Trichoderma* (*T. harzianum*), como se ha explicado en el apartado 4.5.1. También se utilizaron macetas de 500 ml y el sustrato mencionado en el apartado 4.4.1, en este caso, sin esterilizar.

4.7.2. Procedimiento experimental

Este ensayo se repitió dos veces, sembrándose 20 semillas con cada tratamiento en cada repetición del ensayo. En primer lugar, se recubrieron las semillas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.6.2. En este caso, se inoculó *T. harzianum* añadiendo $3 \cdot 10^6$ esporas a los 2,5 ml de GA al 1% que se utilizaron para recubrir las semillas antes de la siembra.

La aplicación del recubrimiento y *T. harzianum* sobre las semillas se realizó siguiendo la metodología descrita por Dogaru et al. (2021), con modificaciones. En 50 g de semillas de garbanzo se aplicaron 2,5 mL de GA al 1% con una concentración de conidios de *T. harzianum* de $6 \cdot 10^4$ conidios/g de semillas. Para ello se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer $3 \cdot 10^6$ conidios, los cuales se suspendieron en los 2,5 mL de GA al 1%. Posteriormente, se aplicó el recubrimiento con conidios de *Trichoderma* a las semillas de garbanzo de manera uniforme en toda su superficie, mediante mezclado continuo durante 5 min.

Después de aplicar el recubrimiento, las semillas se dejaron secar 12 horas en una placa Petri abierta, dentro de la cabina de flujo laminar. Posteriormente, se sembraron en macetas de 500 ml con el sustrato de cultivo mencionado en el apartado 4.4.1, en este caso, sin esterilizar. Transcurridos 14 días desde la siembra, se llevó a cabo la inoculación de *A. rabiei*, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.4.3. Quince días después de la inoculación del patógeno, se inició la evaluación de daños de las plantas. Las mediciones tomadas fueron las mismas que las descritas en el apartado 4.4.4.

4.8. Ensayo de producción

El presente ensayo pretende evaluar el impacto de la aplicación de *T. harzianum* a través del recubrimiento GA 1% en la producción de garbanzos, en ausencia de *A. rabiei*.

4.8.1. Material utilizado

Para la realización de este ensayo se utilizaron macetas de 500 ml para la siembra, garbanzos de Fuentesauco, GA de SaporePuro (Italia), el hongo *T. harzianum*, una pipeta para la inoculación, una báscula y el sustrato mencionado en el apartado 4.4.1, que en esta ocasión no fue esterilizado en autoclave.

4.8.2. Procedimiento experimental

Para la realización de este ensayo, se aplicaron tratamientos diferenciados a las semillas sembradas, aplicándose siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.7.2:

- Control: se sembraron las semillas aplicando agua destilada estéril como recubrimiento, sin *T. harzianum*.
- GA 1%: se recubrieron las semillas con GA al 1% antes de sembrarlas.
- Agua + Th: se recubrieron las semillas con una dilución de conidios de *T. harzianum* en agua destilada estéril.
- GA 1% + Th: se recubrieron las semillas con una dilución de conidios de *T. harzianum* en GA al 1%.

El ensayo se repitió dos veces, en cada uno de ellos se recubrieron 15 semillas con cada tratamiento, siguiendo los pasos descritos en el apartado 4.6.2. Las semillas fueron sembradas en macetas de 500 ml que contenían el sustrato mencionado en el epígrafe 4.4.1, que en esta ocasión no fue esterilizado en autoclave. Durante el crecimiento, las plantas se mantuvieron en un invernadero y se les proporcionó riegos periódicos hasta su madurez, comenzando a recolectar las vainas a los 70-80 días. Posteriormente, se extrajeron los garbanzos de éstas y se registró el número de garbanzos obtenidos por planta, así como el peso total de los mismos.

4.8.3. Análisis estadístico

Para evaluar las mediciones obtenidas en los ensayos de antagonismo *in vitro*, así como los daños registrados en diferentes etapas de los ensayos in planta y los resultados del ensayo de producción, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y test de comparaciones múltiples. Este análisis permitió determinar si los tratamientos aplicados tuvieron un efecto significativo en el crecimiento del patógeno. La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza fue analizada para cada variable por medio del Test Shapiro y Bartlett, respectivamente. En aquellos casos que se cumplieron tanto la normalidad como la homogeneidad de varianzas, se efectuó un ANOVA clásico de un factor y un test HSD Tukey. Por el contrario, para aquellas variables en las que alguna de las dos condiciones no se cumplió, se aplicaron métodos robustos (García-Pérez, 2010). En concreto, se realizó un ANOVA de un factor y un test de comparaciones múltiples usando el procedimiento generalizado de Welch aplicando una transformación mediante un recorte de 0,1 de las colas. Para ello, se usó el paquete Wilcox' Robust Statistics (WRS2) implementado en el software R (Mair & Wilcox, 2020).

En los ensayos *in planta*, se llevaron a cabo análisis de supervivencia basadas en el estimador no paramétrico Kaplan-Meier utilizando el paquete Survival (Therneau, 2023). Las curvas de supervivencia fueron creadas con la función "Survfit" y las diferencias entre las distintas curvas fue analizada con la función "Survdiff".

En cuanto a los ensayos de germinación de esporas de *T. harzianum* y de semillas bajo la influencia del recubrimiento, se llevó a cabo un análisis de chi-cuadrado (χ^2) de Pearson. Este análisis se empleó para evaluar el efecto de los tipos de recubrimiento y porcentajes de dilución sobre la germinación. La corrección de Yates fue aplicada en aquellos casos en los que la frecuencia esperada era inferior a 5.

Todos los datos obtenidos en las mediciones se procesaron utilizando el lenguaje de programación R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

5. RESULTADOS

Todos los ensayos descritos en el apartado 4 fueron realizados por duplicado o triplicado para garantizar la reproducibilidad y precisión de los resultados. Sin embargo, a continuación se presentarán únicamente los resultados de una de las repeticiones del ensayo, representativa del resto.

5.1. Ensayo de antagonismos *in vitro*

5.1.1. Medio de cultivo PDA

Tanto a las 48 como a las 72 horas, los datos mostraron homogeneidad de varianzas (Bartlett's K-squared = 2,42; $p = 0,79$ y Bartlett's K-squared = 0,81; $p = 0,98$, respectivamente), pero no siguieron una distribución normal. Los ANOVAs no paramétricos mostraron en ambos casos que no existían diferencias significativas entre tratamientos ($F_{we} = 2,71$; $p = 0,11$ y $F_{we} = 1,85$; $p = 0,21$, respectivamente) (Figura 15).

A las 96 horas todas las distribuciones de los tratamientos mostraban normalidad. La homogeneidad de varianzas entre los tratamientos fue confirmada nuevamente (Bartlett's K-squared = 1,98; $p = 0,85$). En este punto, el análisis de ANOVA reveló un efecto significativo del tipo de tratamiento ($F = 5,92$; $p = 0,002$). El análisis post-hoc de Tukey indica que *T. atroviride*, *T. hamatum* y *T. harzianum* mostraron una disminución significativa en el área colonizada por el patógeno en comparación con el control (Figura 15).

Al llegar a las 120 horas, las distribuciones de los tratamientos fueron normales y la homogeneidad de varianzas entre ellos se confirmó (Bartlett's K-squared = 2,94; $p = 0,71$). En este momento, el ANOVA también reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 10,24$; $p < 0,001$). El test de comparaciones múltiples (Tukey) mostró que *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum* y *T. harzianum* tuvieron diferencias significativas respecto al control, disminuyendo el área colonizada por *A. rabiei* (Figura 15).

Finalmente, a las 144 horas, las distribuciones de *T. asperellum* y *T. atroviride* no fueron normales, pero se mantuvo la homogeneidad de varianzas entre los tratamientos (Bartlett's K-squared = 2,66; $p = 0,75$). El análisis de varianza reveló un efecto significativo del tipo de tratamiento en el área cubierta ($F_{we} = 12,06$; $p = 0,001$). Por último, el test de Tukey mostró que existieron reducciones significativas en el área colonizada por el patógeno, especialmente en los tratamientos *T. atroviride* y *T. harzianum* en comparación con el control (Figura 16). También mostraron diferencias significativas con el control, aunque en menor medida, los tratamientos *T. asperellum* y *T. hamatum* (Figura 15).

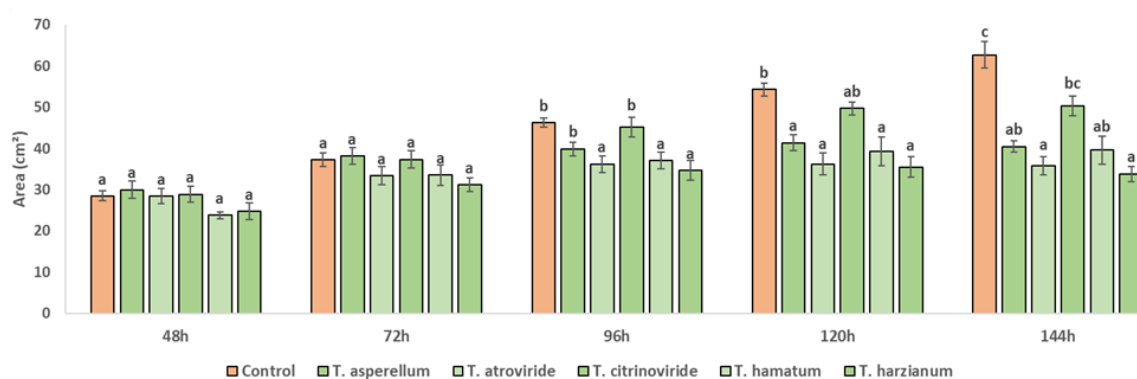


Figura 15. Área colonizada por *A. rabiei* en presencia de distintas especies de *Trichoderma* en distintos momentos del ensayo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

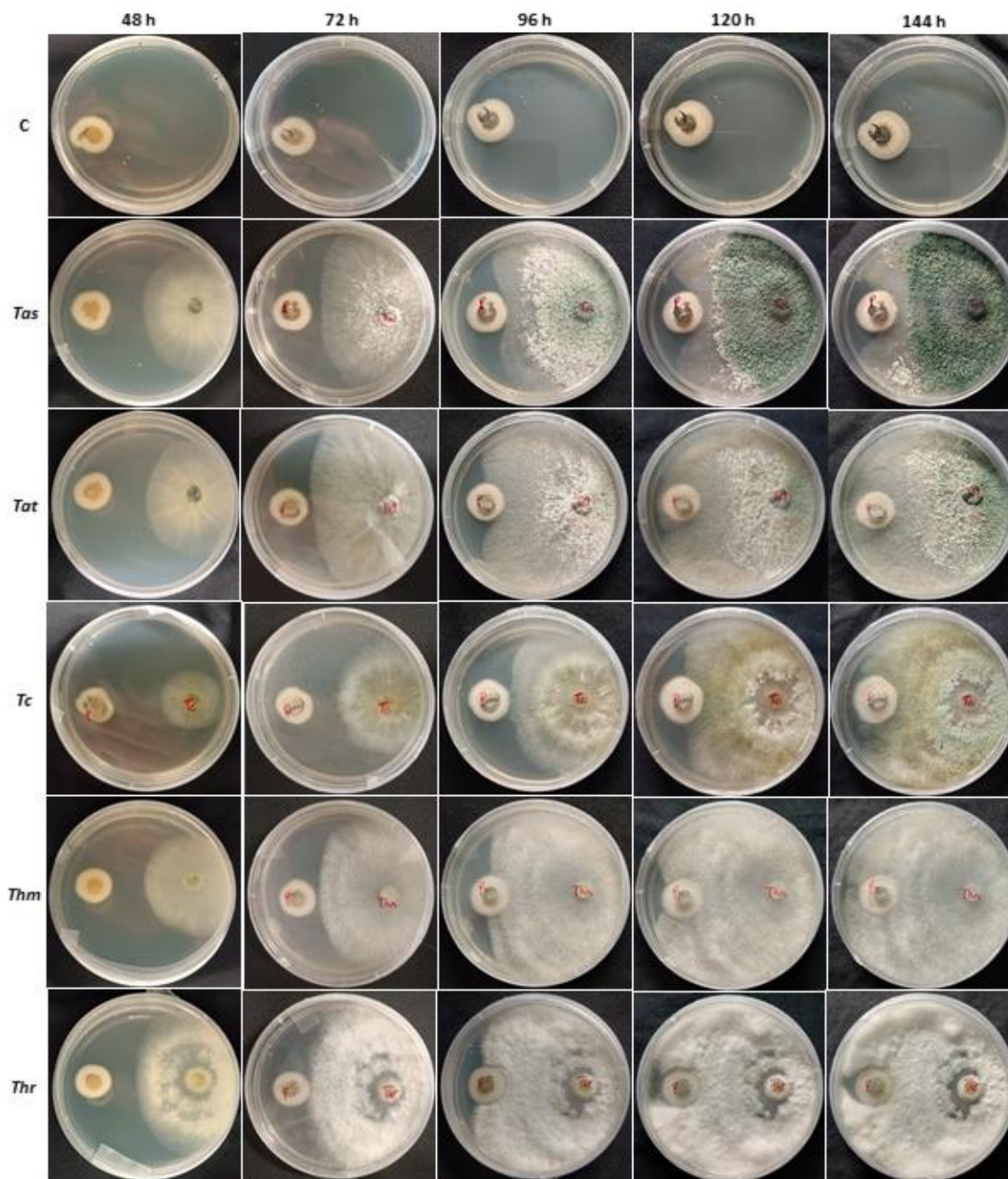


Figura 16. Fotografías del ensayo de antagonismos in vitro en medio de cultivo PDA, entre *A. rabiei* (a la izquierda de las placas) y diferentes especies de *Trichoderma* (a la derecha de las placas). C: control, Tas: *T. asperellum*, Tat: *T. atroviride*, Tc: *T. citrinoviride*, Thm: *T. hamatum*, Thr: *T. harzianum*

5.1.2. Medio de cultivo CSMDA

A las 48 horas, se confirmó la normalidad en todas las distribuciones de los tratamientos, incluyendo el Control. Las varianzas entre los tratamientos fueron homogéneas (Bartlett's K-squared = 4,34; $p = 0,50$). Mediante el ANOVA se observó un efecto significativo del tipo de tratamiento en el área cubierta ($F = 4,17$; $p = 0,007$). Sin embargo, el análisis post-hoc de Tukey no mostró diferencias significativas de ningún tratamiento frente al control (Figura 17).

Al alcanzar las 72 horas, se reafirmó la normalidad en las distribuciones de todos los tratamientos. También se mantuvo la homogeneidad de varianzas (Bartlett's K-squared = 6,81; $p = 0,12$) y el ANOVA reveló diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F = 5,66$; $p = 0,001$). Concretamente, se destacaron diferencias significativas en la disminución del área colonizada por *A. rabiei* en los tratamientos *T. hamatum* y *T. harzianum* respecto al control (Figura 17 y Figura 18).

Para las 96 horas, todos los tratamientos mostraron distribuciones normales. La homogeneidad de varianzas se confirmó (Bartlett's K-squared = 5,78; $p = 0,33$). Se encontró un efecto significativo del tipo de tratamiento en el área colonizada por el patógeno ($F = 10,36$; $p < 0,001$). El análisis post-hoc de Tukey reveló diferencias significativas entre el control y todos los tratamientos, excepto *T. citrinoviride* (Figura 17).

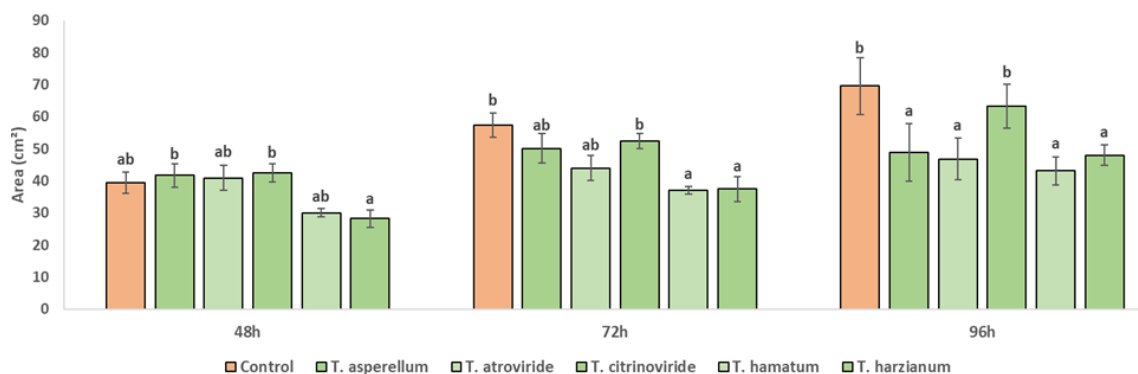


Figura 17. Área colonizada por *A. rabiei* en presencia de distintas especies de *Trichoderma* en distintos momentos del ensayo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

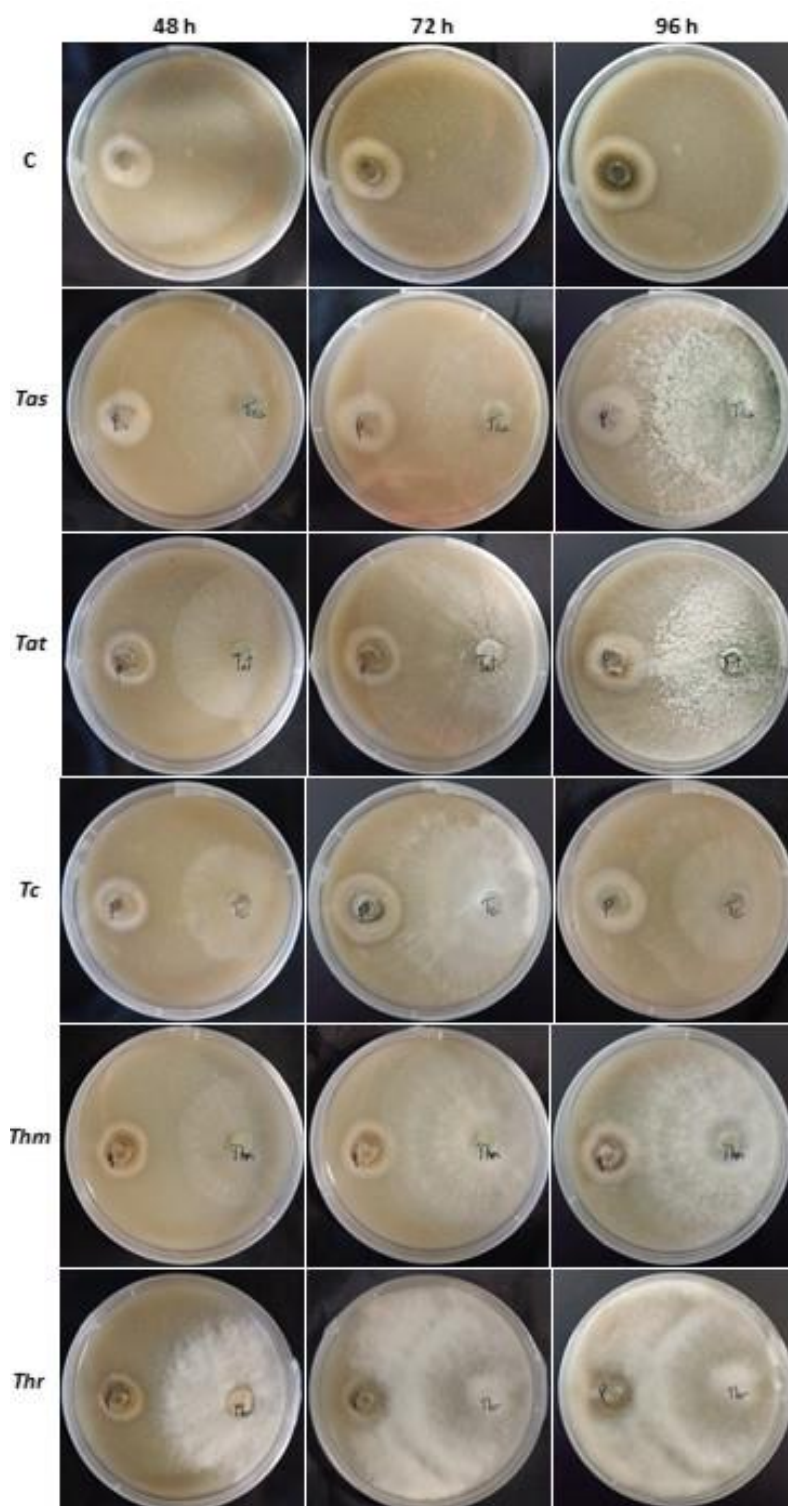


Figura 18. Fotografías del ensayo de antagonismos in vitro en medio de cultivo CSMDA, entre *A. rabiei* (a la izquierda de las placas) y diferentes especies de *Trichoderma* (a la derecha de las placas). C: control, Tas: *T. asperellum*, Tat: *T. atroviride*, Tc: *T. citrinoviride*, Thm: *T. hamatum*, Thr: *T. harzianum*.

5.2. Ensayo *in planta* con inoculación radicular de *Trichoderma*

5.2.1. Análisis de daños causados por el patógeno

Los resultados evidenciaron una falta de distribución normal en todos los casos. La homogeneidad de las varianzas se confirmó mediante la prueba de Bartlett (Bartlett's K-squared = 0,93517; $p = 0,9676$). El ANOVA mostró que no hubo diferencias significativas en el daño causado a las plantas entre los diferentes tratamientos con *Trichoderma* y el control ($F_{we} 0,66$; $p = 0,65$). Esto confirma que los tratamientos de *Trichoderma* no tuvieron un efecto significativo en la reducción del daño causado por el patógeno en las plantas inoculadas, en comparación con el control (Figura 20).

Al examinar las medias de daño para cada tratamiento, se observó que las plantas del control mostraron la media más alta de daño (3,46), mientras que las plantas tratadas con *Trichoderma* mostraron medias de daño similares (alrededor de 3,1). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 19).

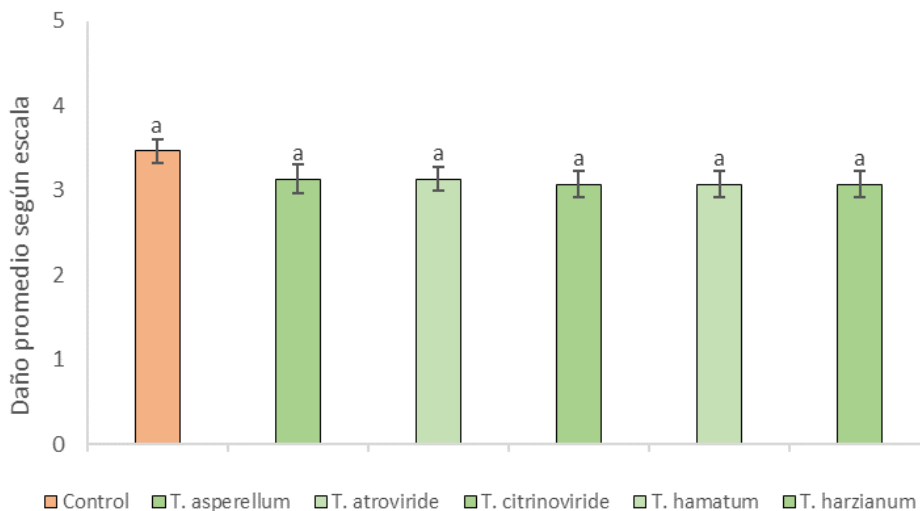


Figura 19. Valor promedio del daño de las plantas tras 15 días de la infección del patógeno para cada tratamiento según la escala definida. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

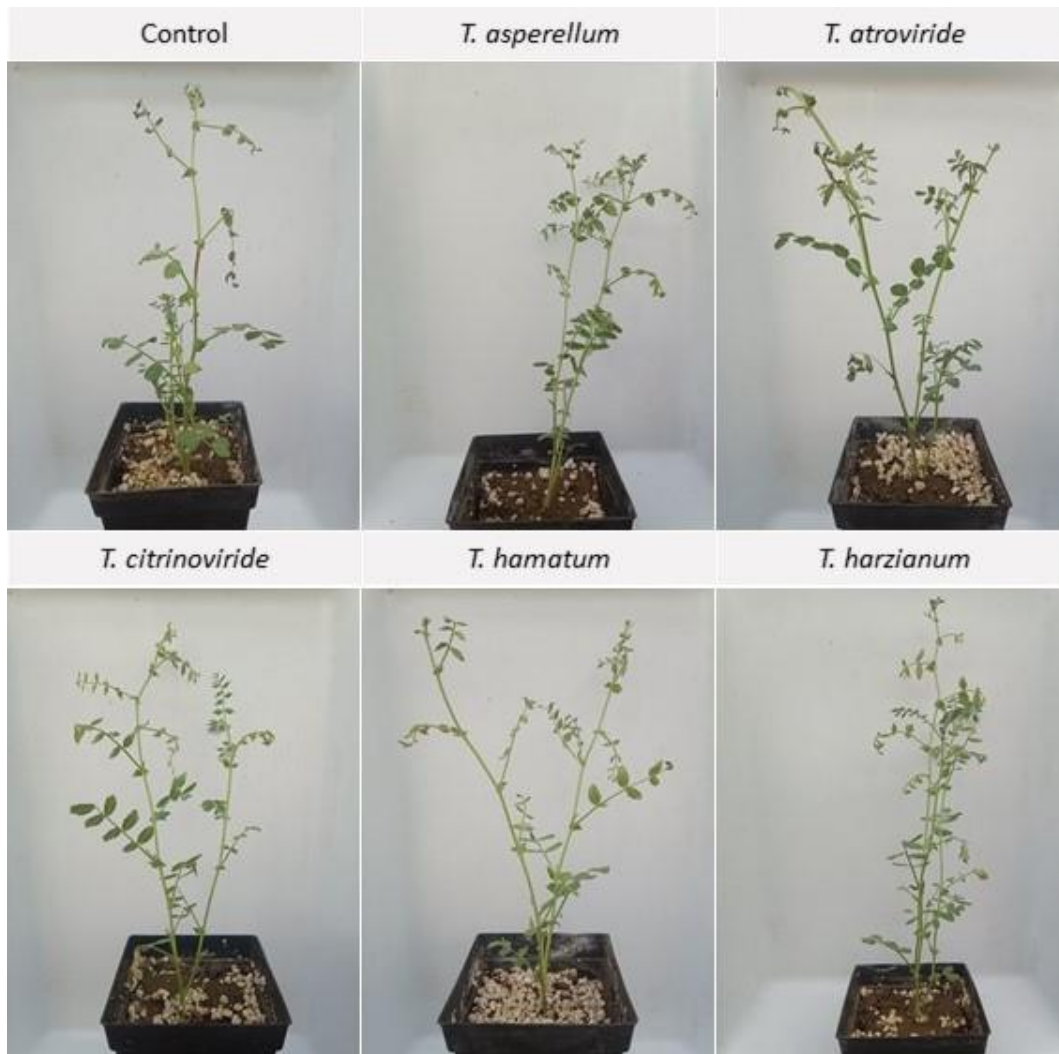


Figura 20. Fotografías de plantas de cada tratamiento tras 15 días de la inoculación del patógeno.

5.2.2. Análisis de supervivencia de las plantas

El análisis de supervivencia realizado para evaluar el efecto de diferentes cepas de *Trichoderma* en la supervivencia de las plantas revela diferencias notables entre los tratamientos. Las plantas tratadas con *T. atroviride* tuvieron una supervivencia del 80% a los 15 días, disminuyendo al 40% el día 39. En contraste, el grupo control comenzó con una supervivencia del 54% y cayó al 0% en el mismo período (Figura 21). Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa ($\chi^2 = 5,00$; $p = 0,03$).

Por otro lado, el tratamiento con *T. harzianum* también demostró superioridad comparativa y una mejora estadísticamente significativa respecto al control ($\chi^2 = 6,70$; p

= 0,01), empezando con una supervivencia del 86,7% y manteniendo un 40% al final del estudio (Figura 21). En contraste, los tratamientos con *T. asperellum* y *T. citrinoviride* no mostraron una mejora estadísticamente significativa respecto al control ($\chi^2 = 0,90$; $p = 0,30$ y $\chi^2 = 0$; $p = 0,90$, respectivamente). *T. asperellum* redujo su supervivencia del 73,3% inicial a 20% y *T. citrinoviride* de un 80% a solo un 6,7% (Figura 21). Finalmente, *T. hamatum* siguió un patrón similar al control, disminuyendo de un 80% inicial a 13,3% (Figura 21), sin alcanzar significancia estadística ($\chi^2 = 1,60$; $p = 0,20$).

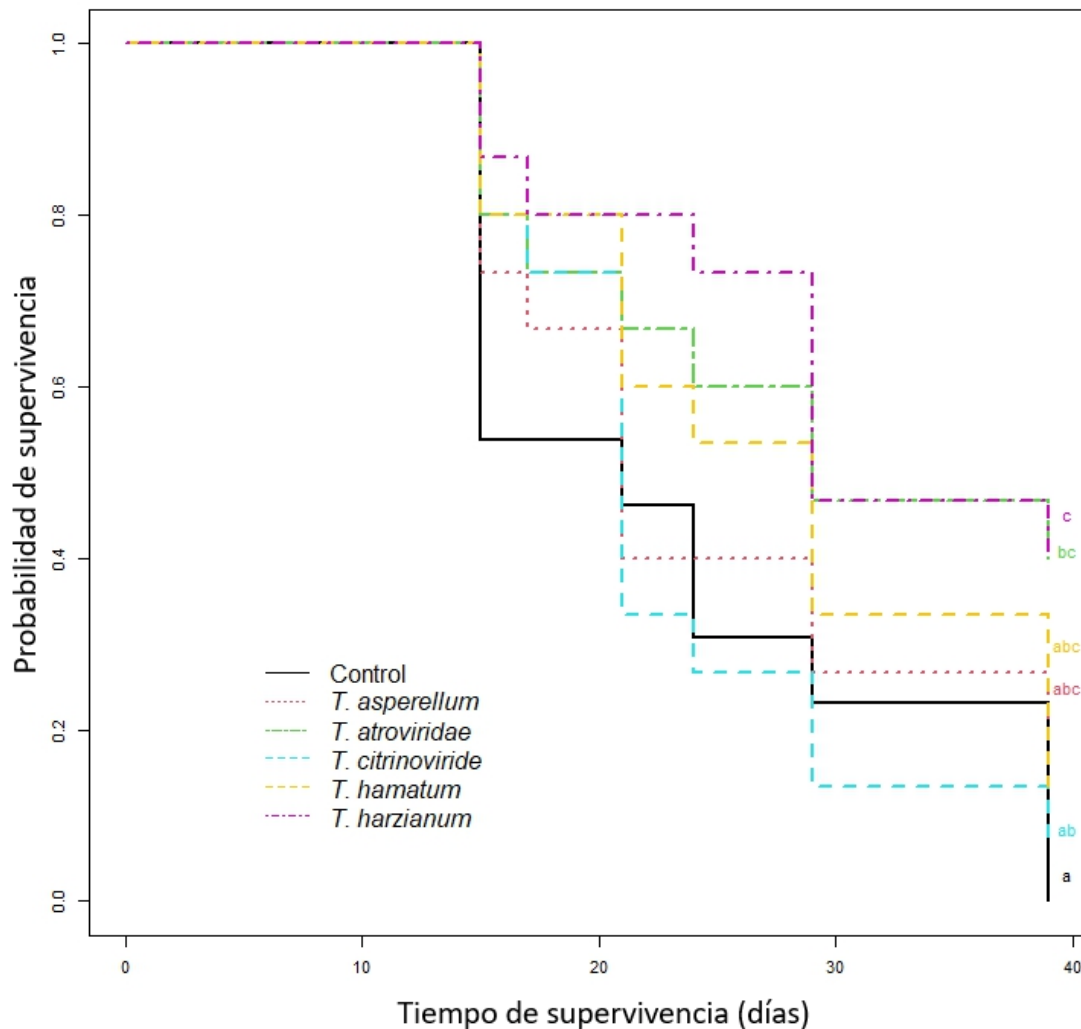


Figura 21. Curva de supervivencia de plantas tratadas con diferentes especies de *Trichoderma*. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

5.3. Ensayo de compatibilidad de esporas de *T. harzianum* con los recubrimientos

Tras 12 horas de incubación, se observó un incremento estadísticamente significativo en la germinación de conidios de *T. harzianum* con el uso de diferentes recubrimientos y concentraciones, en comparación con el control. Específicamente, los tratamientos con PS al 1%, 3% y 5%, GA al 1% y 5%, y NaA al 3%, 5% y 7% tuvieron un efecto positivo en la germinación de conidios, siendo PS al 1% el más favorable (Tabla 8). Por otro lado, el recubrimiento a base de CMC demostró una inhibición total en la germinación de conidios de *T. harzianum* (Tabla 8).

A las 24 horas, se observó un incremento estadísticamente significativo en la germinación de conidios de *T. harzianum* con el uso de recubrimientos a base de PS (en concentraciones de 1%, 3%, 5% y 7%), GA (1%, 5% y 7%) y NaA (3%, 5% y 7%) en comparación con el control (Tabla 9). Además, los tratamientos con PS al 1%, 3% y 5% mostraron un aumento significativo en la germinación de conidios en comparación con los recubrimientos con GA al 3% o NaA al 3%. De manera similar, los tratamientos con GA en concentraciones de 1%, 5% y 7% reportaron una germinación de conidios significativamente mayor que GA al 3% (Tabla 9).

Estudio y desarrollo de bio-inoculante basado en *Trichoderma* spp. en semilla de garbanzo de Fuentesauco (IGP) para el control efectivo de la rabia (*Ascochyta rabiei*, Pass)

Tabla 8. Matriz de chi-cuadrado que compara el número de conidios de *T. harzianum* germinados y no germinados entre los diferentes recubrimientos, tras 12 horas de incubación.

	H ₂ O (0.8%)	PS 1% (15.1%)	PS 3% (6.1%)	PS 5% (4.3%)	PS 7% (2.9%)	CMC 1% (0%)	CMC 3% (0%)	CMC 5% (0%)	CMC 7% (0%)	GA 1% (4.6%)	GA 3% (3.6%)	GA 5% (7.5%)	GA 7% (3.4%)	NaA 1% (3.1%)	NaA 3% (5.4%)	NaA 5% (3.8%)	NaA 7% (6%)
H ₂ O (0.8%)																	
PS 1% (15.1%)	***																
PS 3% (6.1%)	**	**															
PS 5% (4.3%)	*	**	NS														
PS 7% (2.9%)	NS	***	NS	NS													
CMC 1% (0%)	X	X	X	X	X												
CMC 3% (0%)	X	X	X	X	X	X											
CMC 5% (0%)	X	X	X	X	X	X	X										
CMC 7% (0%)	X	X	X	X	X	X	X	X									
GA 1% (4.6%)	*	**	NS	NS	NS	X	X	X	X								
GA 3% (3.6%)	NS	***	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS							
GA 5% (7.5%)	***	*	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	NS						
GA 7% (3.4%)	NS	***	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	NS	NS					
NaA 1% (3.1%)	NS	***	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	NS	*	NS				
NaA 3% (5.4%)	**	**	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	NS	NS	NS	NS			
NaA 5% (3.8%)	*	***	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
NaA 7% (6%)	**	**	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

NS: diferencias no significativas; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; X: Ausencia de germinación en alguno de los tratamientos comparados.

Tabla 9. Matriz de chi-cuadrado que compara el número de conidios de *T. harzianum* germinados y no germinados entre los diferentes recubrimientos, tras 24 horas de incubación

	H ₂ O (1.3%)	PS 1% (21.6%)	PS 3% (19.8%)	PS 5% (17%)	PS 7% (20.8%)	CMC 1% (0%)	CMC 3% (0%)	CMC 5% (0%)	CMC 7% (0%)	GA 1% (17%)	GA 3% (1.3%)	GA 5% (17.5%)	GA 7% (17.8%)	NaA 1% (4.7%)	NaA 3% (12.9%)	NaA 5% (12.7%)	NaA 7% (12.9%)
H₂O (1.3%)																	
PS 1% (21.6%)	***																
PS 3% (19.8%)	***	NS															
PS 5% (17%)	***	NS	NS														
PS 7% (20.8%)	***	NS	NS	***													
CMC 1% (0%)	X	X	X	X	X												
CMC 3% (0%)	X	X	X	X	X	X											
CMC 5% (0%)	X	X	X	X	X	X	X										
CMC 7% (0%)	X	X	X	X	X	X	X	X									
GA 1% (17%)	***	NS	NS	***	NS	X	X	X	X								
GA 3% (1.3%)	NS	***	***	NS	***	X	X	X	X	***							
GA 5% (17.5%)	***	NS	NS	***	NS	X	X	X	X	NS	***						
GA 7% (17.8%)	***	NS	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	***	NS					
NaA 1% (4.7%)	NS	***	***	***	***	X	X	X	X	***	NS	***	***				
NaA 3% (12.9%)	***	NS	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	***	NS	NS	**			
NaA 5% (12.7%)	***	NS	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	***	NS	NS	**	NS		
NaA 7% (12.9%)	***	NS	NS	NS	NS	X	X	X	X	NS	***	NS	NS	**	NS	NS	

NS: diferencias no significativas; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; X: Ausencia de germinación en alguno de los tratamientos comparados.

5.4. Ensayo de compatibilidad de las semillas con los recubrimientos

Después de 5 días de incubación, solo el recubrimiento PS 5% presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control, manifestando una reducción marcada en la germinación. Además, se observó que tanto los recubrimientos GA 1% como NaA 3% ocasionaron un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de germinación en relación con los diversos tratamientos con PS, pero no en comparación al control (Tabla 10).

Al llegar a los 8 días de incubación, el tratamiento con el recubrimiento PS 3% aún mantenía una germinación notablemente menor que el control, aunque no se registraron diferencias significativas con respecto al resto de tratamientos. Por el contrario, el recubrimiento GA 1% alcanzó una tasa de germinación del 100%, superando sustancialmente a los diversos tratamientos con PS y NaA (Tabla 11). Además, se observó un incremento significativo de la longitud de la plúmula en todas las muestras tratadas con GA en comparación con el control (Figura 22).

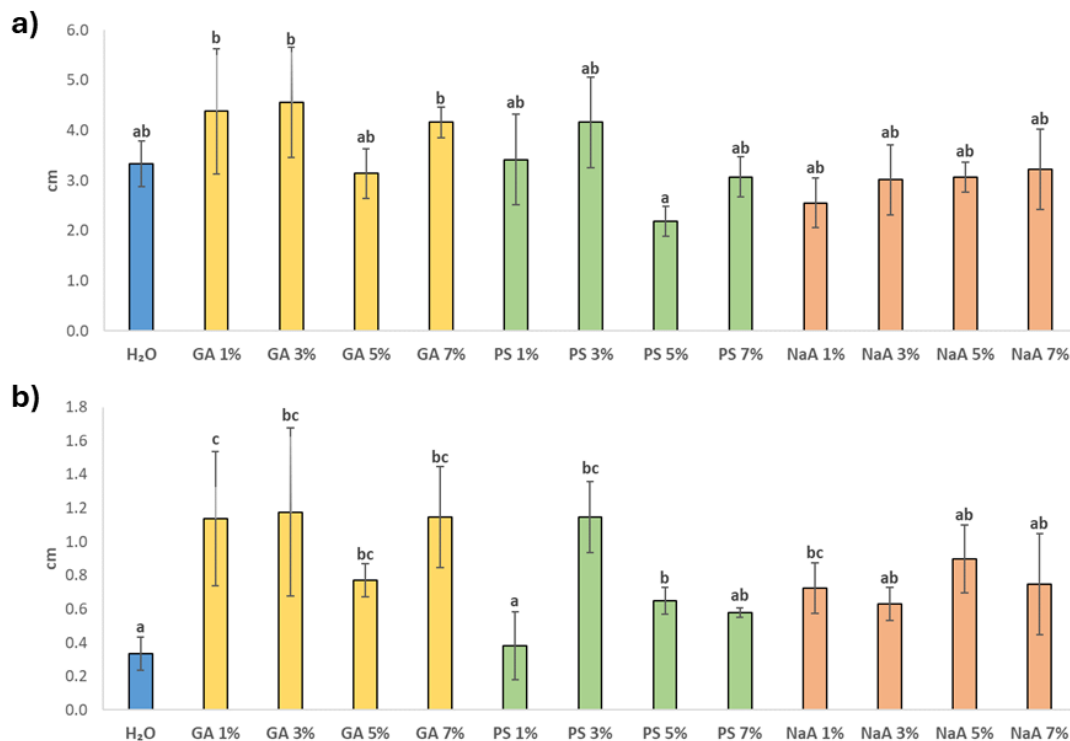


Figura 22. Longitud de la radícula (a) y la plúmula (b) en semillas de garbanzo con 8 días de incubación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Tabla 10. Matriz de chi-cuadrado que compara el número de semillas de garbanzo germinadas y no germinadas entre los diferentes recubrimientos y porcentajes de dilución utilizados, después de 5 días de incubación.

	H ₂ O (80%)	PS 1% (65%)	PS 3% (52%)	PS 5% (25%)	PS 7% (62%)	GA 1% (90%)	GA 3% (80%)	GA 5% (67%)	GA 7% (72%)	NaA 1% (85%)	NaA 3% (87%)	NaA 5% (70%)	NaA 7% (82%)
H₂O (80%)													
PS 1% (65%)	NS												
PS 3% (52%)	NS	NS											
PS 5% (25%)	**	NS	NS										
PS 7% (62%)	NS	NS	NS	NS									
GA 1% (90%)	NS	**	**	***	*								
GA 3% (80%)	NS	NS	*	**	NS	NS							
GA 5% (67%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS						
GA 7% (72%)	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS					
NaA 1% (85%)	NS	NS	*	**	NS	NS	NS	NS	NS				
NaA 3% (87%)	NS	*	**	**	**	NS	NS	NS	NS	NS			
NaA 5% (70%)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
NaA 7% (82%)	NS	*	**	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

NS: diferencias no significativas; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; X: Ausencia de germinación en alguno de los tratamientos comparados.

Tabla 11. Matriz comparativa de chi-cuadrado que compara el número de semillas de garbanzo germinadas y no germinadas entre los diferentes recubrimientos y porcentajes de dilución utilizados, después de 8 días de incubación.

	H ₂ O (90%)	PS 1% (75%)	PS 3% (57%)	PS 5% (72%)	PS 7% (85%)	GA 1% (100%)	GA 3% (82%)	GA 5% (73%)	GA 7% (82%)	NaA 1% (90%)	NaA 3% (80%)	NaA 5% (82%)	NaA 7% (82%)
H₂O (90%)													
PS 1% (75%)	NS												
PS 3% (57%)	**	NS											
PS 5% (72%)	NS	NS	NS										
PS 7% (85%)	NS	NS	*	NS									
GA 1% (100%)	NS	**	***	*	NS								
GA 3% (82%)	NS	NS	*	NS	NS	*							
GA 5% (73%)	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS						
GA 7% (82%)	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	NS					
NaA 1% (90%)	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS				
NaA 3% (80%)	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS			
NaA 5% (82%)	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS		
NaA 7% (82%)	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	

NS: diferencias no significativas; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; X: Ausencia de germinación en alguno de los tratamientos comparados.

5.5. Ensayo in planta con el recubrimiento GA 1% y *T. harzianum*

El tratamiento combinado de GA + Th mostró una tasa de supervivencia inicial del 90%, que se redujo al 27,8% el día 40 (Figura 23). Este tratamiento mantuvo consistentemente tasas superiores de supervivencia en comparación con el control, evidenciando una diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2 = 8,60$; $p = 0,003$). Por otro lado, el tratamiento con H₂O y *T. harzianum* registró la misma supervivencia inicial 90 %, cayendo hasta el 10% el día 40. Este tratamiento no registró diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($\chi^2 = 3,50$; $p = 0,06$). Por último, el tratamiento con GA tuvo una supervivencia inicial del 80%, que disminuyó al 15% al final del estudio (Figura 23). La comparación con el control tampoco reveló una diferencia estadísticamente significativa ($\chi^2 = 3,00$; $p = 0,08$).

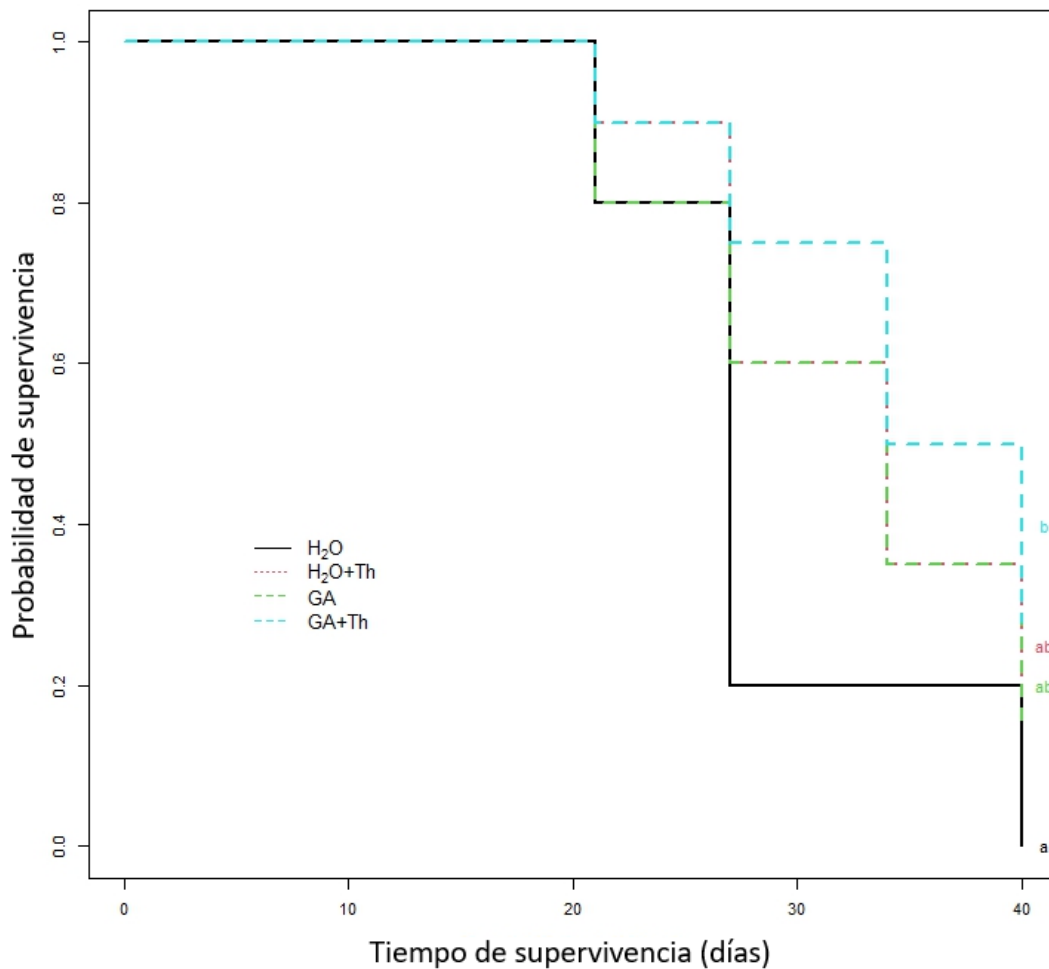


Figura 23. Curva de supervivencia de plantas tratadas con diferentes recubrimientos.

5.6. Ensayo de producción

En el presente ensayo se observó que la media de semillas producidas variaba entre los diferentes tratamientos: GA 1% tuvo una media de 1,47 semillas; GA 1% + Th produjo un promedio de 1,80 semillas; H₂O + Th obtuvo una media de 1,27 semillas; el control (H₂O) tuvo una media 1,87 semillas. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($F_{we} = 0,43$; $p = 0,73$). Además, la diferencia entre la producción promedio de los distintos tratamientos fue pequeña (0,17 semillas/planta), lo que sugiere que las diferencias observadas pueden no ser relevantes (Figura 24).

En cuanto al peso de las semillas, se encontraron resultados similares. El tratamiento GA 1% tuvo una producción promedio de 0,44 gramos por planta, seguido por GA 1% + Th con 0,59 g/planta, el grupo de control con 0,64 g/planta y, finalmente, H₂O + Th con 0,41 g/planta. Al igual que con la cantidad de semillas, en este caso tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{we} = 0,80$; $p = 0,51$) (Figura 25).

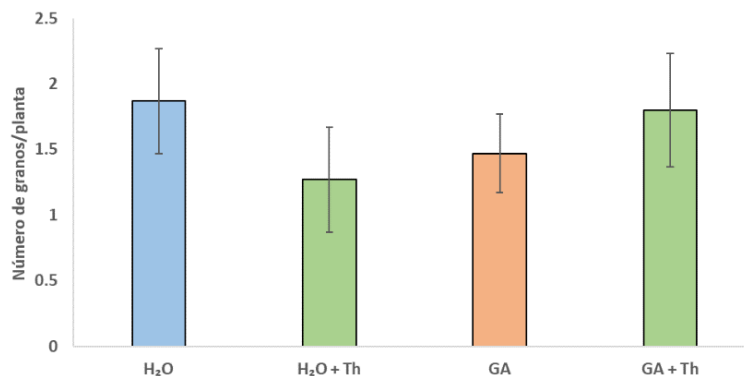


Figura 24. Número de semillas de garbanzo producidas por planta. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

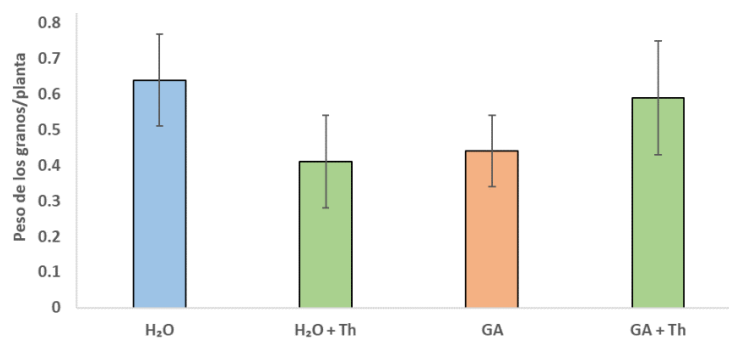


Figura 25. Peso en gramos de las semillas de garbanzo producidas por planta. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

6. DISCUSIÓN

Los ensayos de antagonismo *in vitro* aportan una visión sobre la efectividad antagónica de diversas especies de *Trichoderma* frente al patógeno *A. rabiei*. Inicialmente, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las primeras fases de crecimiento sobre los medios PDA y CSMDA, lo cual sugiere que el período observado pudo haber sido insuficiente para manifestar diferencias notables entre los distintos tratamientos. Específicamente, en el medio PDA se observaron diferencias estadísticamente significativas a las 96 horas en los tratamientos con *T. atroviride*, *T. hamatum* y *T. harzianum*, evidenciando su potencial antagónico. Este efecto se mantuvo en mediciones posteriores a las 120 y 144 horas. En contraste, *T. asperellum* solo mostró diferencias significativas en las fases más avanzadas de crecimiento. Por otro lado, en el medio CSMDA, *T. hamatum* y *T. harzianum* demostraron un efecto antagónico consistente desde las 72 horas. *T. asperellum* y *T. atroviride*, sin embargo, solo exhibieron efectos significativos más adelante, a partir de las 96 horas.

Las especies *T. atroviride* y *T. harzianum* destacaron como los biocontroladores más eficaces. Estos hallazgos coinciden con estudios anteriores (Poveda, 2021), que documentan la capacidad de *T. harzianum* y *T. atroviride* para inhibir el crecimiento de *A. rabiei* mediante mecanismos como la competencia, el micoparasitismo y la antibiosis, los cuales pueden actuar de forma aislada o conjunta. Además, *T. hamatum* y *T. asperellum* también mostraron un efecto significativo en la reducción de la superficie colonizada por el patógeno. Esto respalda los resultados de ensayos de antagonismo *in vitro* previos que evaluaron la capacidad antagónica de *T. hamatum* contra *A. rabiei* (Magar et al., 2020; Poveda, 2021) y la de *T. asperellum* contra *Fusarium oxysporum* (Magar et al., 2020). Por último, *T. citrinoviride* no mostró resultados significativos en ninguna fase del ensayo, lo que contrasta los resultados obtenidos en estudios anteriores (Gezgin et al., 2020).

Cabe destacar que se observaron variaciones en la velocidad de crecimiento y la eficacia antagónica de *Trichoderma* entre los dos medios de cultivo, con un desarrollo más acelerado y una acción antagonista más temprana en el medio CSMDA. Esto

probablemente sea debido a las diferencias en la composición y disponibilidad de nutrientes entre los medios.

El ensayo *in planta* con diferentes especies de *Trichoderma* reveló que los tratamientos con *Trichoderma* no lograron reducir significativamente el daño causado por el patógeno. Esto se contradice con estudios anteriores, que destacan a *T. harzianum* como un tratamiento efectivo para reducir la gravedad de la enfermedad causada por *A. rabiei* (Kumar et al., 2019). De igual manera, se ha descrito a las especies *T. asperellum* y *T. atroviride* como efectivas contra los patógenos *Fusarium equiseti* (Adnani et al., 2024) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Bouregghda & Bouznad, 2009) en plantas de garbanzo, respectivamente.

Por otra parte, los tratamientos con *Trichoderma* sí mejoraron de manera significativa la tasa de supervivencia de las plantas, especialmente los tratamientos con *T. atroviride* y *T. harzianum*. Si bien se han realizado varios estudios con estas dos especies sobre plantas de garbanzo, *T. atroviride* no había sido descrita anteriormente como biocontrolador de *A. rabiei*, aunque sí se ha descrito como biocontrolador contra el patógeno radicular *F. oxysporum* (Poveda, 2021). *T. harzianum*, en su caso, ha sido descrito como promotor del crecimiento vegetal de plantas de garbanzo y como inductor de resistencia sistémica contra el patógeno *Sclerotinia rolfsii* (Saxena et al., 2014). En contraste, *T. asperellum*, *T. citrinoviride* y *T. hamatum* no mostraron mejoras significativas en la tasa supervivencia respecto al control, subrayando la importancia de seleccionar especies y cepas específicas para diferentes cultivos y condiciones experimentales. Estos resultados contradicen los resultados de estudios anteriores, que describen a estas especies como biocontroladores eficaces del garbanzo para diversos patógenos. Anteriormente, *T. hamatum* había sido descrito como un organismo que reduce la marchitez en plantas infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* y *Rhizoctonia solani* (Khan et al., 2014). También hay estudios que sugieren que el tratamiento de semillas con *T. asperellum* es una forma eficaz de controlar el marchitamiento por *F. equiseti* en plantas de garbanzo (Adnani et al., 2024). Por su parte, *T. citrinoviride* no había sido probado como biocontrolador en plantas de garbanzo hasta el momento de este estudio.

Resulta contradictorio que se hayan encontrado diferencias significativas en la supervivencia de las plantas con los distintos tratamientos, pero no se hayan observado diferencias en los daños medidos tras 15 días de la inoculación del patógeno. Esta discrepancia puede deberse a que la medición del daño se realizó demasiado pronto para poder observar diferencias significativas. En ensayos de biocontrol, el tiempo de evaluación es importante, ya que los efectos de los tratamientos biológicos pueden manifestarse gradualmente. Es posible que los mecanismos de defensa inducidos por *Trichoderma*, como la activación de resistencia sistémica o la competencia por nutrientes y espacio, requieran un período más prolongado para ser efectivos contra el patógeno. Por lo tanto, es probable que una evaluación a mayor plazo revele diferencias más pronunciadas en la gravedad del daño causado por el patógeno entre los diferentes tratamientos.

La selección de *T. harzianum* para los siguientes ensayos se justifica por su desempeño consistente tanto *in vitro* como *in planta*, ofreciendo una vía prometedora para el manejo sostenible de la rabia del garbanzo. La siguiente fase del ensayo se centró en seleccionar el mejor recubrimiento para aplicar los conidios de *T. harzianum* sobre las semillas.

Los resultados del ensayo sobre la compatibilidad de los recubrimientos con la viabilidad de las esporas de *T. harzianum* y con las semillas de garbanzo indicaron que los recubrimientos con NaA son compatibles tanto con el bioinoculante como con las semillas. Este recubrimiento tuvo un efecto positivo en la germinación de conidios de *T. harzianum*, resultados respaldados por estudios previos que proponen a este recubrimiento como una de las mejores estrategias para favorecer la viabilidad de los conidios de *T. harzianum* (Chin et al., 2021; Lotfalinezhad et al., 2024). Sin embargo, no tuvo un efecto positivo en la germinación de la planta ni en el desarrollo de la radícula y la plúmula, lo que contradice estudios anteriores que sostenían que el recubrimiento con NaA mejora el rendimiento de las semillas (Chin et al., 2021).

Por otro lado, se observó que el recubrimiento CMC inhibió completamente la germinación de los conidios de *Trichoderma*. Estos resultados contrastan con las conclusiones de estudios previos que proponen que los recubrimientos con CMC y NaA

tienen una mayor eficacia de recubrimiento que la GA y la goma xantana para promover la germinación de conidios de *Trichoderma* (Chin et al., 2021).

En cuanto al PS, se obtuvieron efectos positivos sobre la germinación de *T. harzianum*, pero tuvo un efecto negativo en la germinación de las semillas de garbanzo. Anteriormente, se había demostrado que este recubrimiento era compatible con los conidios de *Trichoderma* (Cortés-Rojas et al., 2021), aunque no se había probado su efecto en la germinación de semillas. Por otra parte, se observó que GA tuvo un efecto positivo sobre la germinación de conidios de *Trichoderma*. Este material había sido descrito con anterioridad como un protector de conidios de *T. harzianum* y *T. asperellum* por microencapsulación (Braga et al., 2019). Además, las semillas tratadas con GA mostraron un aumento significativo en la longitud de la plúmula, sin afectar negativamente a la tasa de germinación. En concreto, el recubrimiento GA 1% logró una germinación del 100% en 24 horas, superando al control que alcanzó un 90%. Este recubrimiento ya había sido descrito como promotor de la germinación de semillas de garbanzo (Aayushee et al., 2023). Por estas razones, el recubrimiento GA 1% se consideró el más beneficioso y se usó para la realización del ensayo *in planta* en el que se inoculó *T. harzianum* mediante el recubrimiento de la semilla.

El ensayo *in planta* con recubrimientos y *T. harzianum* demostró que el tratamiento combinado de GA 1% y este bioinoculante mejora significativamente la supervivencia de las plantas afectadas por *A. rabiei*, sugiriendo una estrategia prometedora de biocontrol. Este resultado está en línea con estudios previos que han demostrado la eficacia de la combinación de GA y *T. harzianum* en la reducción de daños de hongos patógenos, como *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, y *Rhizoctonia solani*. Estos ensayos han concluido que esta combinación no solo mejora la germinación y el crecimiento de la planta, sino que también reduce significativamente la infección por estos patógenos en cultivos de okra y girasol (Dawar et al., 2014).

Por último, el ensayo de producción no mostró diferencias entre la producción de granos de plantas tratadas con *T. harzianum* mediante el recubrimiento de GA 1% y las plantas no tratadas. Estos resultados contradicen los resultados de ensayos anteriores, que

podieron comprobar que la aplicación de dos especies de *Trichoderma* (*T. hamatum* y *T. koningii*) sobre plantas de garbanzo aumentó significativamente la formación de granos por planta (Poveda, 2021). Los resultados del presente trabajo se obtuvieron en condiciones de invernadero, lo cual puede no reflejar adecuadamente las condiciones reales del campo. Sería deseable realizar pruebas adicionales en entornos de campo para evaluar de manera más precisa la eficacia del recubrimiento con *T. harzianum* y GA 1% en la producción de granos. Las condiciones controladas del invernadero pueden limitar el potencial de crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que subraya la necesidad de validar estos hallazgos en un entorno agrícola real para obtener conclusiones más concluyentes sobre la efectividad de este tratamiento.

Estos resultados resaltan la importancia de continuar investigando y desarrollando soluciones basadas en la biotecnología. Esta estrategia de biocontrol tiene un gran potencial para ser aplicada en el sector agrícola, ofreciendo una herramienta sostenible para mejorar la resiliencia del cultivo de garbanzo frente al patógeno *A. rabiei*.

7. CONCLUSIONES

1. Diferentes especies de *Trichoderma*, especialmente *T. harzianum* y *T. atroviride*, demostraron ser efectivas como antagonistas directos de *A. rabiei in vitro*.
2. Los tratamientos radiculares con *Trichoderma*, y en concreto con *T. harzianum*, aumentaron significativamente la supervivencia de las plantas afectadas por el patógeno *A. rabiei*.
3. Los recubrimientos testados, con la excepción de CMC, fueron compatibles con la viabilidad de los conidios de *Trichoderma*. Además, estos recubrimientos no solo mantienen la viabilidad, sino que también promueven la germinación de los conidios.
4. Los recubrimientos GA y NaA son compatibles con la viabilidad de las semillas de garbanzo, sin embargo, solamente GA promueve la germinación de las semillas y el desarrollo de la plúmula. El recubrimiento GA 1% resultó ser el más apto para la aplicación de *T. harzianum* sobre las semillas.
5. El uso del recubrimiento GA al 1% como vehículo para el inóculo de *T. harzianum* a las semillas aumentó significativamente la supervivencia de las plantas afectadas por *A. rabiei* a lo largo del estudio, resultando ser el tratamiento más efectivo.
6. No se observaron diferencias en la producción de semillas entre los tratamientos aplicados, lo que sugiere que el impacto del recubrimiento y *Trichoderma* en la producción de semillas es limitado o nulo en el momento de la medición.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aayushee, Malviya, T., Prabha, M., Tiwari, P., & Singh, V. (2023). Gum Arabic capped Cu/Zn bimetallic nanoparticles for the germination and growth of chickpea. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2023.03.638>
- Ablanque, M., Vicente, P., Mostaza Colado, D., Sanchez Hernández, J., Muñoz Garcia, P., & Marín Peyra, J. F. (2023). *Potenciación y desarrollo del cultivo de garbanzo en la comunidad de Madrid*.
- Adnani, M., Hazzat, N., Msairi, S., El Alaoui, M. A., Mouden, N., Selmaoui, K., Benkirane, R., Ouazzani Touhami, A., & Douira, A. (2024). Exploring the efficacy of a *Trichoderma asperellum*-based seed treatment for controlling *Fusarium equiseti* in chickpea. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 34. <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00771-x>
- Almada Ackermann, B., Aguilar, R., Albrecht, J. C., Alemanno, G., Allende, M. J., Ateca, N., Ávalos Susana, Badini, R., Beltramini, V., Biderbost, E., Bologna, S., Cantareno, M., Caramello, D., Carreras, J., Castro, R., Cavenio, M., & Cisternas, P. (2016). *El cultivo del garbanzo en argentina*. (J. Carreras, V. Mazzuferi, & M. Karlin, Eds.). Universidad de Córdoba.
- Bayraktar, H., Dolar, F. S., & Maden, S. (2007). Mating Type Groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph: *Didymella rabiei*), the Causal Agent of Chickpea Blight in Central Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(1), 41–45.
- Bouregghda, H., & Bouznad, Z. (2009). Biological control of Fusarium wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* and *T. longibrachiatum*. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica*, 44, 25–38. <https://doi.org/10.1556/APhyt.44.2009.1.4>
- Braga, A. B. A. C., Costa, C. J. M., Pomella, A. W. V., Ribeiro, E. J., Santos, L. D., & Zotarelli, M. F. (2019). Evaluation of lethality temperature and use of different

- wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidias by spray drying. *Powder Technology*, 347, 199–206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>
- Charoenrak, P., & Chiradej, C. (2016). Efficacies of wettable pellet and fresh culture of *Trichoderma asperellum* biocontrol products in growth promoting and reducing dirty panicles of rice. *Agriculture and Natural Resources*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.04.001>
- Chin, J. M., Lim, Y. Y., & Ting, A. S. Y. (2021). Biopolymers for biopriming of *Brassica rapa* seeds: A study on coating efficacy, bioagent viability and seed germination. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(3), 198–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jssas.2021.01.006>
- Companiononi, B., Domínguez, G., & García, R. (2019). Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237–248. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000400237&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Cortés-Jiménez, J. M., & Ortiz-Ávalos, A. A. (2019). Manejo de Fertilizantes Químicos y Orgánicos en Garbanzo. In *Simposio Nacional de Garbanzo* (pp. 11–12).
- Cortés-Rojas, D., Beltrán-Acosta, C., Zapata-Narvaez, Y., Chaparro, M., Gómez, M., & Cruz-Barrera, M. (2021). Seed coating as a delivery system for the endophyte *Trichoderma koningiopsis* Th003 in rice (*Oryza sativa*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 1889–1904.
- Cumagun, C. J. R. (2014). Advances in formulation of *Trichoderma* for biocontrol. In V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, & M. Tuohy (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 527–531). <https://doi.org/doi:10.1016/B978-0-444-59576-8.00039-4>.

- del Moral, J., Mejías, A., & López Manuel. (1996). *El cultivo del garbanzo. Diseño para una agricultura sostenible*. LG. SALJEN S.A.
- De los Ángeles, P. (2017). *Desarrollo de estrategias de biocontrol para un manejo fitosanitario sustentable de cultivos de importancia regional*. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- De Rossi, R. L., Guerra, F. A., Lábaque, M., Vuletic, E., Drudi, V., Brücher, E., Plazas, M. C., & Guerra, G. D. (2018). *Notas de Sanidad Vegetal. Serie fitopatológica*. Universidad Católica de Córdoba.
- Dogaru, B.-L., Stoleru, V., Mihalache, G., Yonsel, S., & Popescu, M.-C. (2021). Gelatin Reinforced with CNCs as Nanocomposite Matrix for *Trichoderma harzianum* KUEN 1585 Spores in Seed Coatings. *Molecules*, 26(19), 5755.
- Echevarría, A., Triana, A., Rivero, D., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2019). Generalidades del cultivo de garbanzo y alternativa biológica para el control de la Marchitez. *Cultivos Tropicales*, 40(4).
- FAO. (2017). *El futuro de la alimentación y la agricultura. Tendencias y desafíos*. 1–52.
- FAO. (s.f.). FAOSTAT. Recuperado el 12 de junio de 2024, de <https://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Gan, Y. T., Siddique, K. H. M., MacLeod, W. J., & Jayakumar, P. (2006). Management options for minimizing the damage by *ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research*, 97, 121–134.
- García Pérez, A. (2010). *Estadística básica con R* (1st ed.).
- Gezgin, Y., Maral Gül, D., Sözer Şenşatar, S., Kara, C. U., Sargin, S., Sukan, F. V., & Eltem, R. (2020). *Evaluation of Trichoderma atroviride and Trichoderma citrinoviride growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer*. 45(2), 163–175. <https://doi.org/doi:10.1515/tjb-2018-0378>

- Gupta, R., & Bar, M. (2020). *Plant Immunity, Priming, and Systemic Resistance as Mechanisms for Trichoderma spp. Biocontrol* (pp. 81–110). https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_5
- Harman, G. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190–194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma: Importancia Agrícola, Biotecnología y Sistemas de Fermentación para Producir Biomasa y Enzimas de Interés Industrial. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Junta de Castilla y León. (2019). *Pliego de Condiciones de la IGP «Garbanzo de Fuentesauco»*.
- Khan, M., Ashraf, S., Rasool, F., Salati, K., Mohiddin, F., & Haque, Z. (2014). Field performance of *Trichoderma* species against wilt disease complex of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Rhizoctonia solani*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38, 447–454. <https://doi.org/10.3906/tar-1209-10>
- Klein, D., & Eveleigh, D. E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium* (pp. 57–74).
- Kumar, A., Kumar, V., Kumar, G., & Jackson, K. (2019). In vitro and in vivo bio efficacy of some new generation fungicides and antagonistic microbes against *Ascochyta* blight caused by *Ascochyta rabiei* on Chickpea. *Think India Journal*, 22(34), 262–282.
- Kumar, A., Thaku, M., & Rani, A. (2014). *Trichoderma: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. African Journal of Agricultural Research*, 9, 3838–3852.

- Kumar, D., Archana, T. S., Kumar, V., Singh, S., Sawant, K., Hussain, R., & Kumar, G. (2023). Role of rhizobacterial volatile compounds in increasing plant tolerance to biotic and abiotic stresses. *Rhizobiome: Ecology, Management and Application*, 61–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-16030-1.00002-X>
- Lotfalinezhad, E., Taheri, A., Razavi, S. E., & Sanei, S. J. (2024). Preparation and assessment of alginate-microencapsulated *Trichoderma harzianum* for controlling *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* on tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, 129278. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2024.129278>
- Magar, S., Patange, A., & Somwanshi, S. (2020). In vitro efficacy of fungicides, bioagents and silver nanoparticles against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Indian Phytopathology*, 73. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00182-1>
- Mair, P., & Wilcox, R. (2020). Robust statistical methods in R using the WRS2 package. *Behavior Research Methods*, 52(2), 464–488. <https://doi.org/10.3758/s13428-019-01246-w>
- Manzar, N., Kashyap, A. S., Goutam, R. S., Rajawat, M. V. S., Sharma, P. K., Sharma, S. K., & Singh, H. V. (2022). *Trichoderma*: Advent of Versatile Biocontrol Agent, Its Secrets and Insights into Mechanism of Biocontrol Potential. *Sustainability*, 14(19).
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.*, 28, 1–11.
- Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (2022). Superficie y Producciones de Cultivos. In *Anuario de Estadística* (pp. 283–286).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (s.f.). I.G.P. Garbanzo de Fuentesauco. Recuperado el 12 de junio de 2024, de https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/dop-igp/legumbres/IGP_gfuentesauco.aspx

- Moreiras, O., Carbajal, Á., Cabrera, L., & Cuadrado, C. (2013). *Tablas de composición de alimentos* (Pirámide, Ed.). Pirámide.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Oszust, K., Cybulska, J., & Frąć, M. (2020). How Do *Trichoderma* Genus Fungi Win a Nutritional Competition Battle against Soft Fruit Pathogens? A Report on Niche Overlap Nutritional Potentiates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124235>
- Pande, S., Sharma, M., Gaur, P. M., Tripathi, S., Kaur, L., Basandrai, A., Khan, T., Gowda, C. L. L., & Siddique, K. H. M. (2011). Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to *Ascochyta* blight disease of chickpea. *Australasian Plant Pathol*, 149–156.
- Pelagio-Flores, R., Esparza Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-Induced Acidification Is an Early Trigger for Changes in *Arabidopsis* Root Growth and Determines Fungal Phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*, 08. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00822>
- Poveda, J. (2018). *Investigación básica y aplicada en la interacción Trichoderma-Brassicaceae*. Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal.
- Poveda, J. (2021). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Ascochyta rabiei* infecting protected geographical indication Fuentesauco-Chickpea by *Trichoderma* species. *Eur J Plant Pathol*, 160, 825–840.
- Consejo de la Unión Europea. (2006). Reglamento (CE) No 510/2006 del Consejo, de 20 de marzo de 2006, sobre la protección de las indicaciones geográficas y de

las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 93, 12-25.

Rubio Moreno, J., Caballo Linares, C., Millán Valenzuela, T., Flores Gil, F., & Gil Ligerio, J. (2021). *Estudio Sobre Diferentes Dosis y Fechas de Siembra de Garbanzo en la Campaña de Córdoba*. 4–4.

Saxena, A., Raghuwanshi, R., & Singh, H. B. (2014). *Trichoderma* species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. *Journal of Basic Microbiology*, 195–206.

Singh, R., Kumar, K., Purayannur, S., Chen, W., & Kumar Verma, P. (2022b). *Ascochyta rabiei*: A threat to global chickpea production. *Molecular Plant Pathology*, 1241–1261.

Singh, V., Upadhyay, R. S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research*, 193, 74–86.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.002>

Tribunal de Cuentas Europeo. (2020). *Uso sostenible de productos fitosanitarios: pocos progresos en la medición y en la reducción de riesgos*. Tribunal de Cuentas Europeo.

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek Ewa, & Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4).

Van Rhijn, P., & Jos Vanderleyden. (1995). The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124–142.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mr.59.1.124-142.1995>

- Vargas Hoyos, H., & Gilchrist, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagonica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*, 42, 9–16.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S., & Lorito, M. (2008). A novel role for The *Trichoderma*-plant interaction *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Youssef, S., Tartoura, K., & Abdelraouf, G. (2016). Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.001>