

# Compatibilidad *in vitro* entre *Rhizobium* sp. (CIAT 899) y cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y *Pochonia chlamydosporia* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams



<https://cu-id.com/2247/v37n3e06>

## *In vitro* compatibility between *Rhizobium* sp. (CIAT 899) and strains of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg and *Pochonia chlamydosporia* (Kamyschko ex Barron and Onions) Zare Gams

Danay Ynfante Martínez<sup>1\*</sup>, Ivonne González Marquetti<sup>1</sup>, Belkis Peteira Delgado-Oramas<sup>1</sup>, Jersys Arévalo Ortega<sup>1</sup>, Rolisbel Alfonso de la Cruz<sup>1</sup>, Benedicto Martínez Coca<sup>1</sup>, Belkis Morales Mena<sup>2</sup>, Susana Gorrita Ramirez<sup>1</sup> María Caridad Nápoles García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, (CENSA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, AP 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INCA). San José de las Lajas. Provincia Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar la compatibilidad *in vitro* entre *Rhizobium* (CIAT 899) con cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, y *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams. La compatibilidad se determinó mediante la antibiosis (previo al contacto; a las 48 y 240 horas) y la competencia por espacio a través de la técnica del Cultivo Dual (según la escala de grados referida por Bell y el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento radial). Momento antes del contacto con la colonia de *Rhizobium*, las colonias de *T. asperellum* y la de *P. chlamydosporia*, mostraron un efecto inhibitorio respecto al control; en el caso de *P. chlamydosporia*, sin diferencias significativas. A las 96 horas, las cepas de *T. asperellum* se ubicaron en el grado 1 de la escala de Bell; mientras que, *P. chlamydosporia* se ubicó en el grado 2, a los 18 días. En este momento, las cepas de *T. asperellum* no mostraron inhibición frente a *Rhizobium*, respecto al control; sin embargo, para *P. chlamydosporia* este efecto fue disminuyendo, mostrado 2,5 % de inhibición a los 18 días.

**Palabras clave:** agentes de control biológico, biofertilizantes, interacción microbiana.

**ABSTRACT:** The present work was developed with the objective of evaluating the *in vitro* compatibility of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, and *Pochonia chlamydosporia* (Kamyschko ex Barron and Onions) Zare and Gams with *Rhizobium* biofertilizer (CIAT 899). The dual culture technique was used to determine compatibility by evaluating antibiosis (prior to their contact with the *Rhizobium* colony; at 48 hours and ten days) and competition for space (according to the grade scale referred to by Bell and the calculation of the percentage of the radial growth inhibition). Prior to the contact, the colonies of *T. asperellum* and *P. chlamydosporia* showed an inhibitory effect with respect to the control; with no significant differences in the case of *P. chlamydosporia*. At 96 hours, the *Trichoderma* strains were in grade 1 on the scale referred to by Bell, while *Pochonia* was in grade 2 at 18 days. Compared with the control, the evaluated strains of *Trichoderma* did not show inhibition to *Rhizobium* at 96 hours; *Pochonia* showed a decreasing effect with 2.5 % inhibition at 18 days.

**Keywords:** biological control agents, biofertilizer, microbial interaction.

### INTRODUCCIÓN

En las plantas, los indicadores de crecimiento, desarrollo y producción, se ven afectados por el déficit de determinados nutrientes como el fósforo, el potasio, el hierro y, fundamentalmente, del nitrógeno el que, aunque se encuentra abundante en estado gaseoso en la naturaleza (78 % de la atmósfera) (1, 2), no está siempre disponible para las plantas. Este último elemento

es determinante para el desarrollo y crecimiento de las plantas, específicamente de las leguminosas, que son afectadas cuando es pobre el contenido de nitrógeno en los suelos. Por ello, se realizan aplicaciones de fertilizantes nitrogenados los que, a través del tiempo, ocasionaron problemas irremediables de contaminación, ya que muchos acaban en ríos, lagunas, océanos y hasta en agua potable (3, 4).

\*Correspondencia a: Danay Ynfante Martínez. E-mail: [danay@censa.edu.cu](mailto:danay@censa.edu.cu)

Recibido: 08/08/2022

Aceptado: 11/10/2022

Como resultado de las investigaciones para hallar nuevas alternativas que permitan disminuir los costos de las producciones agrícolas y las contaminaciones, se cuenta en la actualidad con bioproductos que pueden actuar como biofertilizantes que favorecen y estimulan el crecimiento de las plantas, así como sus respuestas de defensa (5, 6).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), que nodulan en las raíces de las leguminosas y fijan nitrógeno (*Rhizobium* spp.), constituyen una opción natural de fertilización. Estas bacterias se producen a gran escala y se añaden como inoculantes a semillas de diversos cultivos agrícolas hace más de 100 años, con resultados alentadores (3).

En el suelo, la asociación de microorganismos, aseguran un equilibrio ecológico estable. No obstante, Sadowsky (7) demostró que *Rhizobium* compite por sitios, en las raíces de las leguminosas, para iniciar el proceso de nodulación, influenciado por una serie de factores, entre estos la competencia por espacio y/o nutrientes con otros microorganismos del suelo, como pudieran ser algunos hongos de los géneros *Trichoderma* y *Pochonia*.

Estos hongos habitan comúnmente en la rizosfera de las plantas, colonizan diversos sustratos y sobreviven a condiciones adversas, a través de la producción de metabolitos y clamidosporas (8, 9, 10, 11). Esos organismos tienen la capacidad de colonizar endofíticamente las raíces de diversos cultivos y poseen un efecto estimulante sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, mediante la inducción de respuestas bioquímicas y estructurales de la planta o la biosíntesis de fitohormonas (12, 13, 14). Esta promoción del crecimiento podría ayudar a la planta a “escapar”, desde fases tempranas, al ataque de agentes fitopatógenos causantes de enfermedades (15) y nematodos fitoparásitos (16). Por otra parte, la capacidad endofítica de estos agentes biológicos, puede conferirles a las plantas resistencia para enfrentar situaciones de estreses bióticos o abióticos presentes en su hábitat natural (17, 18).

La antibiosis es uno de los mecanismos de acción antagónica más conocido entre microorganismos presentes en la rizosfera, al disputarse nutrientes o ubicación espacial (19, 20). Actualmente, para favorecer los rendimientos agrícolas, y evitar costos de aplicación por plaguicidas se utilizan productos a base de mezclas de microorganismos, luego de realizar estudios previos, sobre los efectos de sus mecanismos frente a cada agente microbiano.

Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la compatibilidad *in vitro* entre *Rhizobium* (CIAT 899) y cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, y *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Micología Vegetal (LMV) del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (Latitud 22,991867 y Longitud -82,153892), ubicado en el municipio San José de las Lajas, provincia Mayabeque, Cuba.

Para la evaluación de la antibiosis y la competencia por el espacio se desarrolló el método del Cultivo Dual (CD), descrito por Martínez y Solano (21). Se probaron cuatro cepas de *T. asperellum* y una de *P. chlamydosporia* frente a *Rhizobium*.

Las condiciones de crecimiento de los hongos pertenecientes a la colección del LMV del CENSA, antes del CD fueron las siguientes: las cepas *Ta.13*, *Ta.78*, *Ta.85* y *Ta.90* de *T. asperellum* y de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) se sembraron en placas Petri ( $\varnothing = 90$  mm) con medio Agar Malta (AM, BioCen) y Papa Dextrosa Agar (PDA, BioCen) y pH 5,6, e incubaron a temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, bajo régimen de oscuridad constante. Mientras que, la cepa de *Rhizobium* (CIAT 899), donada gentilmente por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), se cultivó en Agar Nutriente (AN, BioCen) a temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  y oscuridad constante.

El montaje de la técnica (CD) (21) se realizó en placas Petri ( $\varnothing = 90$  mm) que contenían medio de cultivo PDA (BioCen) con pH 5,6. Para ello, se sembró, a cinco mm del borde de la periferia de la placa Petri, un disco (cinco mm de  $\varnothing$ ) proveniente de la zona de crecimiento activo en la periferia de las colonias puras de *T. asperellum*, crecidas sobre AM durante tres días y de *P. chlamydosporia* de 15 días en PDA; y diametralmente opuesto, se sembró una azada en estrías a partir de un cultivo puro de la cepa bacteriana, crecida en AN. Se realizaron cinco réplicas por tratamiento (*Trichoderma-Rhizobium* y *Pochonia-Rhizobium*), y se incluyeron controles de cada cepa, sembradas independientemente y en igual posición que en el CD.

Las placas se incubaron durante siete días a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , para la interacción de *Rhizobium* con las cepas de *T. asperellum* y sus respectivos controles y 18 días a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con *P. chlamydosporia* y sus controles, bajo régimen de oscuridad constante. El crecimiento de los hongos se midió con una regla milimetrada. Las evaluaciones para *Trichoderma* se realizaron cada 24 h, después de la siembra; mientras que, el crecimiento radial de *P. chlamydosporia* se comenzó a evaluar a partir del tercer día y sucesivamente a los siete, diez y 18 días.

La antibiosis se evaluó al comparar el crecimiento de los hongos (*Trichoderma* o *Pochonia*) en el CD, con el de los respectivos controles, antes del momento de contacto con la bacteria a las 48 y 240 horas, respectivamente (21).

La competencia de estos hongos sobre la bacteria se realizó en las mismas placas donde fue evaluada la antibiosis. El antagonismo de los hongos frente a la cepa

bacteriana se determinó, según la escala de grados referida por Bell *et al.* (22) y se determinó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) en cada momento de evaluación, con el empleo de la fórmula de Samaniego *et al.* (23):  $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$

Donde, R1 es el crecimiento radial del hongo en el tratamiento control y R2 es el crecimiento radial del hongo en el cultivo dual.

Transcurridas 168 horas, se extrajo un fragmento de la zona donde ocurrió la interacción entre *Trichoderma* y *Rizobium*, y se depositó en placas Petri con medio de cultivo PDA (BioCen) e incubó en iguales condiciones a las descritas anteriormente. El efecto de la bacteria sobre el crecimiento de *Trichoderma* o viceversa se evaluó por la obtención de colonias de ambos microorganismos, a partir de la muestra sembrada de la interacción.

Los datos obtenidos, a partir de los ensayos, se procesaron a través de un Análisis de Varianza simple (ANOVA) y las medias se compararon por LSD Fisher con un nivel de significación ( $p \leq 0,05$ ), mediante el paquete informático estadístico InfoStat Profesional versión 2017 (24).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las 24 horas, las cepas de *T. asperellum* mostraron un crecimiento más rápido en el CD respecto al control, excepto Ta.85 (Fig. 1), lo que pudiera ser por algún (nos) compuesto(s) excretado(s) por *Rhizobium*, que estimule(n) las cepas de *Trichoderma*. En sus estudios, Woo y Lorito (25) y Talibi *et al.* (26) declararon que las hifas de *Trichoderma*, en su crecimiento hacia el hospedante, se estimulan por moléculas procedentes del mismo, como aminoácidos y azúcares. A las 48 horas, previo al contacto, las colonias del hongo presentaron valores estadísticamente inferiores, con respecto a las del control, excepto la cepa

Ta.13. En este sentido, algunos autores demostraron que *Rhizobium* tiene el potencial necesario para producir compuestos extracelulares (como la trifolitoxina) con actividades antimicrobianas directas o moléculas de alto peso molecular llamadas rizobiocinas (o bacteriocinas medianas) las que, por sus propiedades biocidas, desempeñan una función muy importante en la competencia a nivel rizosférico (27). Esto pudiera ser la respuesta al resultado en la antibiosis, donde participa este tipo de compuesto que inhibe el crecimiento de hongos en su microambiente, como parte de su interacción por un nicho, lo que provocó inhibición en el crecimiento de las cepas de *T. asperellum*.

Estos resultados son similares a los informados por Becker *et al.* (28), quienes encontraron inhibición del crecimiento de *Trichoderma* frente a *Sinorhizobium* respecto al control, a las 48 horas.

A las 96 horas, las cepas de *T. asperellum* se ubicaron en la clase 1 de la Escala de Bell *et al.* (22) en el enfrentamiento con la cepa de *Rhizobium*; *Trichoderma* sobrecrece completamente la colonia bacteriana y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo, dado a su velocidad de crecimiento y adaptación (29). Esto sugiere que, posiblemente, la excreción de metabolitos por parte de *Rhizobium* disminuyó o las cepas de *Trichoderma* se adaptaron a estos durante el enfrentamiento (8) (Fig. 2B).

En todos los casos evaluados, se evidenció un incremento del área colonizada por las cepas de *T. asperellum* con el aumento de la edad del cultivo, frente a la cepa bacteriana, hasta cubrir totalmente la superficie de la placa.

Algunos autores (30, 31, 32) confirmaron que la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* también es un atributo vital para su acción como biocontrolador de agentes fitopatógenos de diversos cultivos ya que, al colonizar con mayor rapidez la zona de la rizosfera y los espacios del suelo, en general, limita o detiene completamente su proliferación.

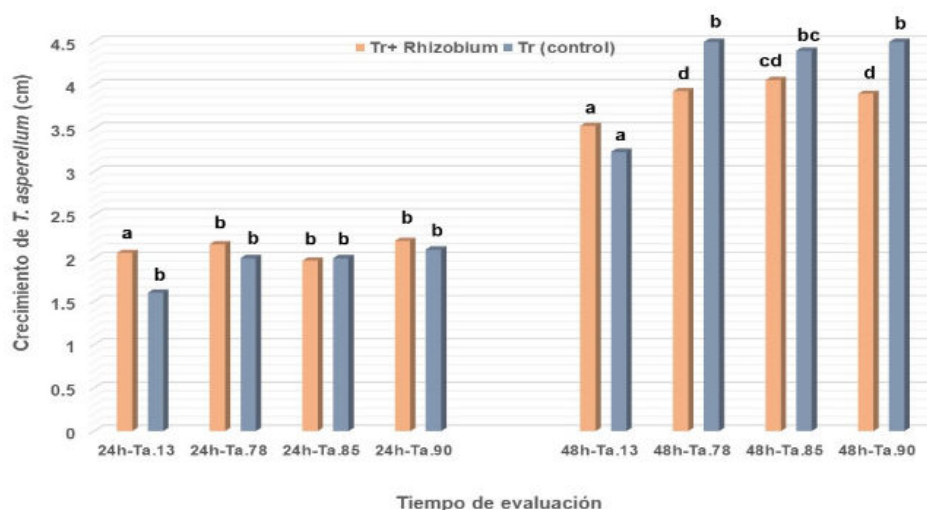
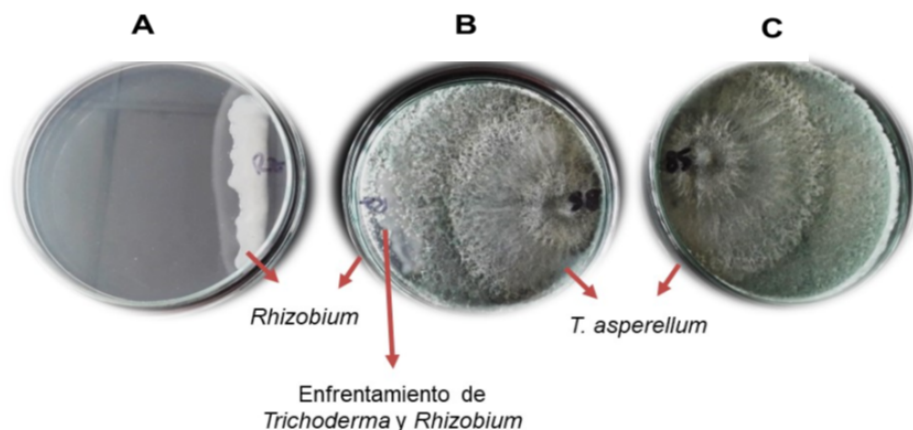


Figura 1. Inhibición del crecimiento radial de *T. asperellum* en CD a las 24 y 48 horas / Inhibition of the radial growth of *T. asperellum* in dual culture at 24 and 48 hours.



**Figura 2.** Enfrentamiento de *T. asperellum* y de *Rhizobium* sp. en CD a las 96 horas [A: control de *Rhizobium*, B: enfrentamiento de *T. asperellum* y *Rhizobium*, C: control de *T. asperellum*] / Confrontation of *T. asperellum* and *Rhizobium* sp. in dual culture at 96 hours [A: control of *Rhizobium*, B: confrontation of *T. asperellum* and *Rhizobium*, C: control of *T. asperellum*].

El análisis de los resultados del PICR ratificó los obtenidos con la aplicación de la escala de Bell *et al.* (22) a las 96 horas, ya que las cepas de *Trichoderma* no mostraron inhibición en su crecimiento, en confrontación con *Rhizobium*, respecto al control. A pesar de que *Trichoderma* cubrió completamente la placa y en algunos casos hubo sobrecrecimiento sobre la colonia bacteriana (Fig.2 B), al realizar la siembra de varios puntos de la zona de interacción entre *Trichoderma* y *Rhizobium*, no se visualizaron efectos negativos sobre la fisiología de estos microorganismos; es decir, dicho efecto solo se debió a un fenómeno de competencia, mecanismos de acción de especies cuando están en interacción.

*Trichoderma* es un excelente competidor con otros microorganismos del suelo por sustratos y exudados radicales; por tanto, este mecanismo es un elemento a considerar en la interacción del antagonista y la rizobacteria, cuando se encuentren en un mismo nicho ecológico. Este aspecto presupone que, para un mejor establecimiento y función de ambos organismos en la rizosfera de las plantas, pudiera considerarse la inoculación de *Rhizobium* previa a la de *T. asperellum*, aunque entre ellos no existan efectos adversos.

Para corroborar los efectos de combinaciones de agentes biológicos, algunos investigadores, como Becker *et al.* (20), obtuvieron un aumento significativo del rendimiento de materia seca (MS) y la producción de biomasa (PB) total de la planta con las aplicaciones de *Bradyrhizobium* sp. y a los 15 días *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34. Esto supone que no hubo competencia ni efecto inhibitorio sobre los nódulos por parte del hongo, ya que el periodo de formación de los nódulos en la leguminosa transcurrió sin la presencia de *T. harzianum*; resultados constatados, además, por Freitas *et al.* (33). Hoyos-Carvajal *et al.* (34) plantearon que *T. asperellum*, al solubilizar el fosfato a partir de  $\text{Ca}_3\text{PO}_4$  y/o roca fosfórica, aumentó su dispo-

nibilidad para las plantas. Por lo tanto, el incremento en los valores fisiológicos pudo deberse a la efectividad de los nódulos en los tratamientos coinoculados, ya que podría ser consecuencia del aumento de fósforo, nutriente clave para el éxito de la nodulación (35).

Por su parte, Becker *et al.* (32), también en inoculaciones mixtas, evidenciaron resultados inferiores a los de la inoculación fraccionada con la cepa del hongo, pero superiores a la inoculación única con *Bradyrhizobium* y al control absoluto, lo cual indica que *Trichoderma* no presentó un carácter competitivo. Además, constaron que los niveles de proteína nodular detectados en los tratamientos donde se inoculó solamente *T. harzianum* cepa A-34 y donde se aplicó de forma fraccionada con *Bradyrhizobium* sp., fueron superiores al resto de los tratamientos, lo cual indicó que la actividad infectiva y de fijación de nitrógeno de los nódulos no se afectó al interactuar con la cepa A-34 de *T. harzianum*. En este sentido, Das *et al.* (36) encontraron incrementos en el rendimiento de la biomasa cuando se aplicaron *Rhizobium* y *Trichoderma* en combinación. Por su parte, González-Marquetti *et al.* (37) evidenciaron, con la aplicación combinada de dos cepas de *T. asperellum* con Azofert®, al momento de la siembra, un efecto sinérgico marcado sobre la estimulación del crecimiento y la expresión de enzimas específicas de defensa, fenilalanina amonio liasa (PAL), polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD) de *Phaseolus vulgaris* L.

Zaki y Ghaffar (38) indicaron que *Rhizobium* sp. y *T. harzianum*, conjuntamente con otros microorganismos biocontroladores pueden coexistir, si evitan la competencia directa mediante el uso de diferentes fuentes de nutrientes en diferentes tiempos, así como ejercer acción antagonista sobre fitopatógenos de la rizosfera. Por su parte, Freitas *et al.* (33) evidenciaron mayor sobrevivencia y tolerancia de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., frente a *Rhizoctonia solani*

Kühn, al aplicar *Rhizobium* y *Trichoderma* spp., de manera combinada.

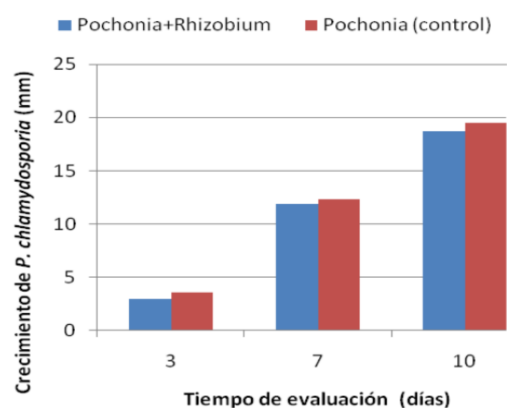
Varias publicaciones justifican los beneficios de las coinoculaciones de microorganismos para la obtención de efectos sinérgicos que potencian el crecimiento y la resistencia al estrés en los cultivos de interés agrícola (39, 40, 41). Sin embargo, investigaciones donde se combinen hongos antagonistas, como es el caso de especies del género *Trichoderma*, con otros promotores del crecimiento, aún son escasas.

A las 240 horas, antes del contacto de *P. chlamydosporia* con la cepa de *Rhizobium*, se observó una disminución del crecimiento del hongo en el CD, respecto al control; sin embargo, las diferencias no fueron significativas (Fig. 3). Esto pudiera estar relacionado con la excreción de metabolitos al medio por la bacteria, similar a lo observado con *Trichoderma* (26).

El antagonismo de *P. chlamydosporia* (cepa IMI SD 187) mostró grado 2 a los 18 días, según la escala de grado referida por Bell *et al.* (22) en el enfrentamiento a *Rhizobium*. El hongo creció aproximadamente sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo, posiblemente dado a su baja velocidad de crecimiento (42), sin descartar un posible efecto metabólico por parte de *Rhizobium*.

En los tratamientos, el crecimiento de la bacteria se detuvo a partir de los 12 días; mientras que, el hongo continuó creciendo hasta ponerse en contacto con la misma a los 18 días, sin evidencias de sobrecrecimiento sobre esta (Fig. 4B).

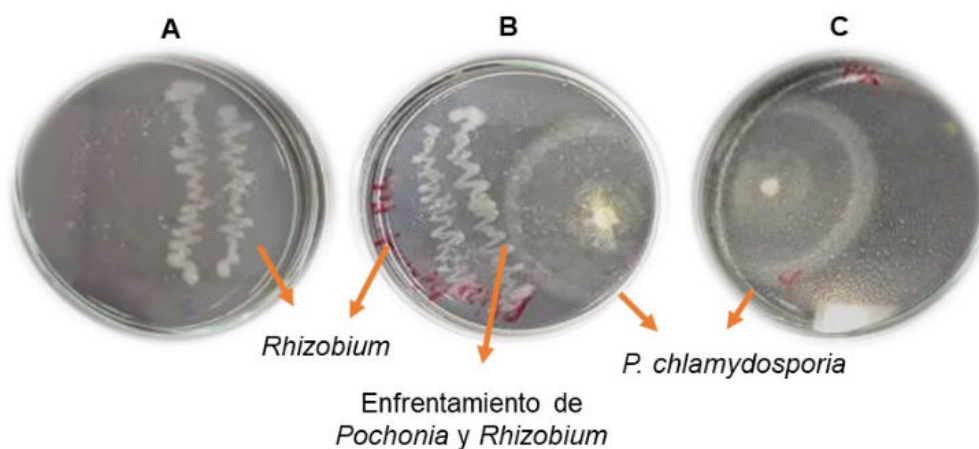
El PICR del hongo frente a la bacteria fue mayor en los primeros tres días de crecimiento con valor de 18,3 %; mientras que, en los diferentes momentos de evaluación, la inhibición que ejerció la bacteria sobre la cepa IMI SD 187 disminuyó con valores entre 2,5 y 4,1 %, en comparación al control.



**Figura 3.** Inhibición del crecimiento radial de *P. chlamydosporia* en CD, a los tres, siete y diez días /Inhibition of the radial growth of *P. chlamydosporia* in dual culture at three, seven, and ten days.

Los resultados indican que *Rhizobium* sp. y *P. chlamydosporia*, pueden coexistir en el mismo tiempo y nicho.

Estos resultados se corresponden con los referidos por Puertas *et al.* (43), quienes encontraron compatibilidad de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y *Rhizobium* sp., ya que al combinarse no se afectó su efectividad sobre nematodos y como biofertilizante, respectivamente, aspecto importante para un manejo integrado. Se relacionan, además, con los de Siddiqui (44) quien no evidenció efecto inhibitorio de *Rhizobium* sp. sobre *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y viceversa. Por otra parte, se corresponden con los informados por Monteiro (45) quien constató que la coaplicación del hongo nematófago y *Rhizobium* no afecta su acción biorreguladora sobre los nematodos agalleros ni la fijación de N<sub>2</sub> en el cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merr). Además, se obtuvieron mayor producción de nódulos bacterianos en las raíces y aumento del contenido de hierro (Fe) en la parte aérea de las plantas.



**Figura 4.** Enfrentamiento de *P. chlamydosporia* y de *Rhizobium* en CD a los 18 días [A: control de *Rhizobium*, B: enfrentamiento de *P. chlamydosporia* y *Rhizobium*, C: control de *P. chlamydosporia*] / Confrontation of *P. chlamydosporia* and *Rhizobium* in dual culture at 18 days [A: control of *Rhizobium*, B: confrontation of *P. chlamydosporia* and *Rhizobium*, C: control of *P. chlamydosporia*].

Los resultados sugieren que *P. chlamydosporia* es capaz de interactuar con diferentes organismos sin perder su acción sobre los nematodos de agallas y de promover el crecimiento de las plantas.

### CONCLUSIONES

Los datos aportados en ambos experimentos tienen efecto positivo para aplicaciones futuras en las que se combinen estos microorganismos, ya que podría producir un efecto sinérgico en las plantas, lo cual favorecería el crecimiento vegetal, así como la inducción de respuestas de defensa para el manejo de plagas en cultivos de interés económico y, además, la reducción de costos por aplicación de estos agentes microbianos.

### AGRADECIMIENTOS

El colectivo de autores desea agradecer a los técnicos Noreidys Fernández-Gálvez y Nerdys Acosta por su colaboración en el montaje del experimento. Este estudio fue realizado dentro del marco de los proyectos “Caracterización Molecular y Mecanismos Indirectos en Cepas Promisorias de *Trichoderma* relacionados con la Fitosanidad” del Programa Nacional de Salud Animal y Vegetal y “Re-cycling of biomass nutrients and carbon for advanced organic fertilization in an ecosmart and climate positive agriculture on Cuba (Bio-C)”, del Schweizerischer National Fonds y el Fondo Nacional de Ciencia (FONCI) y Programa Sectorial de Salud Animal y Vegetal de Cuba.

### REFERENCIAS

1. Fijación Biológica de Nitrógeno Atmosférico. El nitrógeno y su importancia. INTAGRI. 2018. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/fijacion-biologica-de-nitrogeno-atmosferico>. (Consulta: 2 agosto 2022)
2. Fijación Biológica de Nitrógeno: Plantas y Bacterias. 2022. Disponible en: <https://eos.com/es/blog/fijacion-biologica-de-nitrogeno/> (Consulta: 2 agosto 2022)
3. Cuadrado B, Rubio G, Santos W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 2009; 38 (1): 78-104.
4. Mikhailova N. El uso equilibrado de fertilizante gracias a las técnicas nucleares contribuye a aumentar la productividad y a proteger el medio ambiente. Boletín del OIEA. 2020. Disponible en: <https://www.iaea.org/es/newscenter/news/el-uso-equilibrado-de-fertilizante-gracias-a-las-tecnicas-nucleares-contribuye-a-aumentar-la-productividad-y-a-proteger-el-medio-ambiente>. (Consulta: 8 agosto 2022)
5. Nagananda GS, Das A, Bhattacharya S, Kalpana T. *In vitro* studies on the effects of biofertilizers (*Azotobacter* and *Rhizobium*) on seed germination and development of *Trigonellafoenum-graecum* L. using a novel glass marble containing liquid medium. Int J Botany. 2010; 6 (4): 394-403.
6. Boraste A, Vamsi K, Jhadav A, Khairnar Y, Gupta N, Trivedi S, et al. Biofertilizers: a novel tool for Agriculture. Int J Microbiol. 2009; 1 (2): 23-31.
7. Sadowsky MJ. Competition for nodulation in the soybean / *Bradyrhizobium* symbiosis. En: Triplett EW. (Ed.). Prokaryotic nitrogen fixation. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. 2000; 279 pp.
8. Samuels GJ. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. Mycol Res. 1996; 100 (8): 923-935.
9. Bader AN, Salerno GL, Covacevich F, Consolo VF. Bioformulation of *Trichoderma harzianum* in solid substrate and effects of its application on pepper plants. Rev. Fac. Agron. 2020; 119 (1): 1-9. <https://doi.org/10.24215/16699513e037>.
10. Arévalo J, Hidalgo-Díaz L, Martins I, Souza JF, Castro JMC, Carneiro RMDG, et al. Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. Tropical Plant Pathology. 2009; 34 (3):158-163.
11. Ceiro-Catasú WG, Hidalgo-Viltres M, Hidalgo-Díaz L, Arévalo-Ortega J, García-Bernal M, Mazón-Suástegui JM. Establecimiento *in vitro* del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en diferentes suelos. Terra Latinoamericana. 2021; 39: 1-7. e792. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.792>.
12. Larriba E, Jaime MDLA, Nislow C, Martín NJ, López LLV. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. Jour. of Plant Research. 2015; 128 (4): 665-678.
13. Camargo-Cepeda D, Ávila E. Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). Ciencia y Agricultura. 2014; 11 (1): 91-100.
14. Zhao L, Zhang Ya-qing. Effects of phosphate solubilization and phytohormone stress. Jour. of Integrative Agriculture. 2015; 14 (8): 1588-1597.
15. Hoyos-Carvajal L, Duque G, Orduz S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas. 2011; 2 (1): 76-86.

16. Lopez-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, *et al.* Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genetics and Biology*. 2010; 47: 342-351.
17. Kerry BR, Hirsch PR. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the rhizosphere at the population, whole organism and molecular scales. En: Daviers K, Spiedel Y (Eds). *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*. Springer Netherlands. 2011; 171-182.
18. González-Marquetti I, Infante-Martínez D, Arias-Vargas Y, Gorrita-Ramírez S, Hernández-García T, de la Noval-Pons BM, *et al.* Efecto de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre indicadores de crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar BAT-304. *Rev. de Protección Veg.* 2019; 34 (2): 1-10.
19. Salina Ventura R, Boriano Bonilla B. Efecto de *Trichoderma viride* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en el crecimiento de *Capsicum annuum* en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST*. 2014; 2 (2): e32.
20. Bécquer CJ, Ramos Y, Nápoles JA, Dolores AM. Efecto de la interacción *Trichoderma*-rizobio en *Vigna luteola* SC-123. *Pastos y Forrajes*. 2004; 27 (2): 139-145.
21. Martínez B, Solano T. Antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones y Grout. *Rev. Protección Veg.* 1995; 10 (3): 221-225.
22. Bell K, Wells D, Markham R. *In vitro* antagonismo of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathol.* 1982; 72: 379-382.
23. Samaniego G, Ulloa S, Herrera S. Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Rev. Mex. Fitopatología*. 1989; 8: 86-95.
24. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat* [programa de cómputo]. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. 2017. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>.
25. Woo L, Lorito M. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for control. En: Vurro M, Gressel J (Eds). *Novel Biotechnologies for Control Agent Enhancement and Management*. Amsterdam, The Netherlands: IOS, Springer Press. 2007; 107-130.
26. Talibi I, Boubaker H, Boudyach EH, Ait Ben, Aoumar A. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Jour. Applied Microbiol.* 2014; 117 (1): 1-17.
27. Twelker S, Oresnik LJ, Hynes MF. Bacteriocins of *Rhizobium leguminosarum*. A molecular analysis. Highlights of nitrogen fixation research. En: Martínez E. & Hernández G (Eds). *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York. 1999; 20: 105
28. Bécquer CJ, Lazarovits G, Lalin I. Interacción *in vitro* entre *Trichoderma harzianum* y bacterias rizosféricas estimuladoras del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2013; 47 (1): 97-102.
29. Castro-Toro M, Rivillas-Osorio A. *Trichoderma* spp. modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. *Boletín Técnico Cenicafe*. 2012; 38: 31 pp.
30. Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. Translational research on *Trichoderma*: from "omics" to the field. *Annu Rev. Phytopathol.* 2010; 48: 395-417.
31. De la Cruz-Quiroz R, Roussos S, Rodríguez-Herrera R, Hernández-Castillo D, Aguilar CN. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala Int. J. of Modern Science*. 2018; 4: 237-243.
32. Hoyos-Carvajal L, Duque G, Orduz S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2011; 2 (1): 76-86.
33. Freitas-Chagas Junior A, Gonçalves de Oliveira A, Rodrigues dos Santos G, Barbosa-Reis H, França-Borges Chagas L, Oliveira-Miller L. Combined inoculation of rhizobia and *Trichoderma* spp. on cowpea in the savanna, Gurupi-TO, Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2015; 10 (1): 27-33.
34. Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*. 2009; 51 (3): 409-416.
35. Mweetwa AM, Chilombo G, Gondwe BM. Nodulation, nutrient uptake and yield of common bean inoculated with *Rhizobia* and *Trichoderma* in an acid soil. *J. Agric. Sci.* 2016; 8 (12): 61-71.
36. Tanusree Das, Sunita Mahapatra, Srikanta Das. *In vitro* Compatibility Study between the *Rhizobium* and Native *Trichoderma* Isolates from Lentil Rhizospheric Soil. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2017; 6 (8): 1757-1769.
37. González-Marquetti I, Ynfante-Martínez D, Gorrita S, Morales-Mena B, Nápoles MC, Peteira Delgado-Oramas B, *et al.* Efectos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg y Azofert® sobre el crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. de Protección Veg.* 2021; 36 (3): 1-9.

38. Zaki MJ, Ghaffar A. Combined effects of microbial antagonists and nursery fertilizers on infection of mung bean by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Gord. Pakistan Phytopathology. 1995; 1: 17.
39. Tsimilli-Michael M, Eggenberg P, Biro B, Köves- Pechy K, Vörös I, Strasser RJ. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescence transient O- J-I-P. Appl. Soil Ecol. 2000; 15 (2):169-182. ISSN 0929-1393, [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00093-730](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00093-730)
40. Moreira H, Pereira SIA, Vega A, Castro PML, Marques APGC. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria benefit maize growth under increasing soil salinity. J. Environ Manage. 2020; DOI: [10.1016/j.jenvman.2019.109982](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109982).
41. Kavadia A, Omirou M, Fasoula DA, Louka F, Ehaliotis C, Ioannides IM. Co-inoculations with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi alters mycorrhizal composition and lead to synergistic growth effects in cowpea that are fungal combination-dependent. Appl. Soil Ecol. 2021; 167: 104013.
42. Zare R, Gams W, Evans HC. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia. 2001; 73: 51-86.
43. Puertas A, de la Noval BM, Martínez B, Miranda I, Fernández F, Hidalgo-Díaz L. Interacción *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*. Rev. Protección Veg. 2006; 21 (2): 80-89.
44. Siddiqui IA, Shaukat SS. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. J. Phytopathology. 2003; 151: 215-222.
45. Monteiro Avelar TS. Ação combinada de *Pochonia chlamydosporia* e outros microrganismos no controle do nematoide de galhas e no desenvolvimento vegetal. [Tese doctor scientiae]. Universidadde Federal de Viçosa, Brasil. 2017. 100 pp.

**Declaración de conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Contribución de los autores:** Danay Ynfante Martínez: **Conceptualización, metodología, análisis formal, investigación, validación, visualización, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).** Ivonne González Marquetti: **Conceptualización, metodología, análisis formal.** Jersys Arévalo Ortega: **Conceptualización, metodología, supervisión, análisis formal, participó en la redacción y correcciones del artículo.** Rolisbel Alfonso de la Cruz: **Investigación, curación de datos, análisis formal.** Benedicto Martínez-Coca: **Administración de proyecto, adquisición de fondos, conceptualización, metodología, participo en la revisión del artículo.** Belkis Peteira Delgado-Oramas: **Conceptualización, metodología, supervisión, participo corrupciones del artículo.** Susana Gorrita Ramírez: **Investigacion, curación de datos, análisis formal.** Belkis Morales-Mena: **Recursos y supervisión.** María Caridad Nápoles: **Análisis formal, participó en la redacción del borrador.**

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)