

Rhizobium leguminosarum
COMO ORGANISMO BIOCONTROLADOR DE LA INTERACCIÓN
HOSPEDERO-PATÓGENO: CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*)-
Fusarium Oxysporum f.sp.dianthi

Cheol Woo Lee Park, Yolanda Navarro De Navarro*

Recibido: Diciembre 16/98 - Aprobado: Mayo 14/99

Keywords: Biocontrol, *Rhizobium leguminosarum*, *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*, Host-pathogen interaction, Carnation, Vascular Emaciation

RESUMEN

Se investigó el efecto de biocontrol de *Rhizobium leguminosarum* (*R. leguminosarum*) cepa B, contra *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi* (FOD) raza 2, en la interacción Clavel - FOD. Se utilizó la raza 2 de FOD por ser la de mayor patogenicidad y distribución en las fincas de cultivo de clavel en Colombia.

Para ello se establecieron las condiciones de inoculación de FOD sobre cultivos establecidos de *R. leguminosarum*, variando la concentración in vitro de la bacteria. Se encontró una reducción en el número de microconidias hasta un 90% y una inhibición en el crecimiento radial del patógeno de hasta un 71%.

En el ensayo de microcultivo dual se detectó fraccionamiento de las hifas después de 48 horas de incubación con *R. leguminosarum*. En el ensayo in vivo, los

esquejes de clavel *Raggio di sole*, variedad susceptible al patógeno, fueron inoculados con 45.0×10^8 células de *R. leguminosarum* por matero, mostrando una severidad inferior al 5%, una incidencia menor del 20% y una reducción del índice de la enfermedad hasta de un 92% en presencia del patógeno.

ABSTRACT

It was investigated the biocontrol effect of *Rhizobium leguminosarum* (*R. leguminosarum*) strain B on *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi* (FOD) race 2 in the interaction carnation - FOD. On account of the most pathogenic and distributed in the colombian carnation's floricultures, the race 2 of FOD was used.

The FOD inoculation's conditions on stabilized *R. leguminosarum* cultures were set, varying the bacterial concentrations, in vitro, there were a reduction in the number of microchondian until a 90% and a pathogen's radial growth inhibition until a 70%. In microculture assay, it was observed hyphal cracks after 48 hours' incubation with *R. leguminosarum*.

* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santa Fe de Bogotá, Colombia.

In vivo, the carnation cuttings Raggio di sole, susceptible variety to the pathogen, were inoculated with 45.0×10^8 *R. leguminosarum* cells/pot, showed a severity under the 5%, an incidence below the 20% and a reduction of the disease index until a 92 % in presence of the pathogen.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de la agricultura en Colombia, radica en que los cultivos comerciales de importancia como las flores son atacados por microorganismos fitopatógenos. Por esta razón se hace necesario el uso de pesticidas para su control que inducen la resistencia en los patógenos y promueven el uso excesivo, ocasionando contaminación del medio ambiente particularmente en suelos y aguas y generando gastos adicionales en la producción.

El clavel (*Dianthus caryophyllus*) continúa siendo el principal cultivo de exportación de flores en Colombia con una participación de 43.2% del valor total de las exportaciones, sin embargo este liderazgo ha estado limitado por la presencia de diferentes enfermedades dentro de las cuales se destaca el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi* (1). Sus posibles causas están relacionadas con la producción de metabolitos por parte del patógeno tales como el ácido fusárico que afecta la permeabilidad de las membranas causando epinástias de los peciolos, el etileno y el ácido indol acético que tienen una actividad reguladora del crecimiento. Además la producción de polisacáridos que impiden la circulación de agua por el xilema y de enzimas tales como pectin-metilestera-

sa y poligalacturonasa que degradan paredes celulares del xilema produciendo geles que provocan la obstrucción vascular (2).

El patógeno penetra por las raicillas jóvenes o por las heridas producidas en las raíces adultas, crece en los tejidos radicales externos hasta llegar al tejido vascular en forma axial, produciendo micelio que luego invade las raíces y posteriormente el tallo. La planta enferma presenta síntomas característicos como clorosis unilateral ascendente. En estados iniciales se observa en las hojas la mitad clorótica y la otra normal, con un doblamiento de los brotes hacia el lado enfermo por interferencia en el crecimiento manifestándose posteriormente un marchitamiento generalizado que trae como consecuencia la muerte de la planta (3). La colonización del tallo es unilateral, debido a que la diseminación lateral y radial del hongo parece inhibida por las paredes celulares (4).

La escala de Índice de la enfermedad (Tabla 1), se utiliza para estimar la patogenicidad de acuerdo con las investigaciones de Arbeláez y Calderón (5).

Además de su capacidad para fijar nitrógeno, algunas cepas de *Rhizobium* inhiben el crecimiento de hongos patógenos que infectan a nivel radicular tanto a leguminosas como a no leguminosas, produciendo antibióticos (6) y/o un metabolito tóxico llamado rhizobiotoxina. La composición de dicho metabolito no se ha especificado, sin embargo se determinó una máxima absorbancia U.V en 204 nm, unas bandas de absorción de infrarrojo en 1660, 1390 y 1195 cm^{-1} y un test positivo para ninhidrina (7).

Tabla 1. Índices de la enfermedad utilizados en la evaluación de patogenicidad

Índice de la enfermedad	Síntomatología
0	Planta sana
1	Síntoma en el tercio inferior de la planta
2	Síntoma en el tercio medio de la planta
3	Síntoma en el tercio superior de la planta
4	Planta muerta

Malajczuk (6) estudió el efecto de 15 aislamientos (WU 337, WU 400, WU 386, etc.) de *Rhizobium*, sin especificar las cepas, sobre el patógeno *Phytophthora cinnamomi* a nivel de ensayo in vitro observando la lisis de hifas y el desarrollo saprofítico de las bacterias sobre las hifas del patógeno. De forma similar Tu (8) también observó el desarrollo parasítico del *Rhizobium japonicum* en las puntas de las hifas de *Phytophthora megasperma* y la reducción de esporas del patógeno por

la presencia del *R. japonicum* a nivel de ensayo in vitro, mientras que en un ensayo in vivo observó tanto un aumento de peso radicular como la disminución de la severidad por el ataque patogénico.

Este trabajo se desarrolló con el fin de estudiar el efecto de biocontrol sobre el patógeno *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* (raza 2), utilizando *Rhizobium leguminosarum* (cepa B), una bacteria fijadora de nitrógeno presente en los suelos de la Sabana de Bogotá que han sido utilizados previamente en cultivos de leguminosas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales Biológicos

Las principales características de los microorganismos utilizados en este trabajo se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Procedencias y características de los microorganismos usados.

Material	Cepa	Hospedero	Fuente	Características
<i>Fusarium oxysporum f.sp.dianthi</i> (FOD)	Raza 2, aislamiento 56 (5)	<i>Dianthus caryophyllus L.</i>	Departamento de Biología, U. Nal. de Colombia	Ocasiona el marchitamiento vascular
<i>Rhizobium leguminosarum</i> (<i>R. leguminosarum</i>)	cepa B (9)	<i>Pisum sativum</i> <i>Vicia faba</i> (simbioticamente efectiva)	Departamento de Química, U. Nal. De Colombia	Forma nódulos y fija nitrógeno

Metodología

Determinación Del Efecto Biocontrol De Rhizobium leguminosarum Sobre Fusarium oxysporum f.sp.dianthi (10)

Ensayo Dual En Microcultivo

Se preparó el medio LMA-PDA (levadura, manitol y agar - Papa, dextrosa y agar) y se esterilizó a 15 lb/pulg² de presión, 120°C, durante 20 min. El medio se vertió directamente sobre láminas porta objeto (2.1 cm x 7.6 cm) ubicadas dentro de una cámara húmeda previamente esterilizada. Una vez gelificado el medio, se aplicó una asa impregnada de *R. leguminosarum* en uno de los extremos; luego a una distancia de 2.5 cm de la colonia inoculada inicial se sembró un disco de micelio ($r = 0.25$ cm) de FOD previamente cultivado en medio PDA a 27°C durante 7 días.

Los microcultivos fueron incubados a 28°C y las observaciones de su comportamiento se realizaron a las 24, 48 y 72 horas desde su incubación, por medio de un microscopio de luz y con la ayuda de los colorantes Azul de lactofenol y Safranina.

Ensayo Dual In Vitro

Sobre medio LMA-PDA en cajas de petri ($r = 5.0$ cm), se aplicó la suspensión de *R. leguminosarum* con una concentración celular que varió como se indica en la Tabla 3 para cada tratamiento. Una vez establecido el cultivo bacterial durante 48 horas a 28°C, se colocó un disco de papel de filtro ($r = 0.3$ cm) esterilizado en el centro de cada caja de petri. Sobre este disco se aplicó la suspensión de microconidias de FOD con una concentración constante de 24000 microconidias/caja de petri para todos los tratamientos. Se realizaron 4-6 replicas.

Para cuantificar el efecto de biocontrol sobre el patógeno ocasionado por la bacteria y analizar estadísticamente su efecto se realizaron ensayos duales, in vitro. Se determinó el efecto biocontrolador en el modelo (variación de *R. leguminosarum*) tanto sobre el crecimiento radial como sobre la producción de microconidias.

Posteriormente, se realizó la medición del crecimiento radial de la colonia de FOD cada 24 horas, se preparó la suspensión de conidias con agua estéril y se hizo un recuento de microconidias de FOD a los 7 días (168 horas) de incubación utilizando una cámara de Neubauer (11).

Tabla 3. Concentraciones de las suspensiones de FOD y *R. leguminosarum* aplicadas para cada tratamiento.

Modelo :Variación de concentración de <i>R. leguminosarum</i>	FOD (Número de Microconidias/caja de petri)	<i>R. leguminosarum</i> (Número de Células/caja de petri)
Tratamiento 1	24000	1.2×10^6
Tratamiento 2	24000	1.0×10^8
Tratamiento 3	24000	1.0×10^9
Blanco 1-2-3	24000	0

Se llevó a cabo un análisis de varianza de un solo factor con el 95 % de confianza ($\alpha=0.05$) y la comparación de tratamientos con un control.

Ensayo In Vivo

Diseño Experimental

Se empleó un diseño experimental de bloques completos aleatorizados con materos individuales (capacidad; 1 Kg de arena) y 5 plantas de clavel de la variedad susceptible al FOD raza 2 (*Raggio di sole*) por cada tratamiento.

Condiciones Experimentales

Se esterilizaron los materos plásticos con una solución de Hipoclorito de sodio al 2% durante 5 horas y posteriormente se lavaron con agua destilada. Se empleó arena lavada como material para la siembra, la cual se sometió a un flujo constante de agua, durante 6 días, eliminando arcillas presentes; luego se secó al aire libre y se esterilizó en un autoclave, a 15 lb/pulg² de presión y 120°C, durante 30 min.

Se obtuvieron esquejes de clavel de la variedad susceptible a FOD (*Raggio di sole*), con 2 semanas de enraizamiento sin la presencia de FOD provenientes de la finca FLORES JUANAMBU LTDA., BOJACA, CUNDINAMARCA.

Se realizó una prueba de esterilidad en la arena tratada 24 horas antes de la siembra de los esquejes. Para ello se tomó una muestra de 10 ml de la arena preparada y se adicionaron 50 ml de agua estéril, se tomó una alcuota de 1 ml de la suspensión anterior y se depositó en el

medio PDA incubándose posteriormente a 28°C durante 5 días.

Para el ensayo se planearon los siguientes tratamientos: 5 plantas de clavel sin infección por FOD como blanco, 5 plantas de clavel con FOD como control y 5 plantas de clavel con *R. leguminosarum* y FOD tal como se describe en la tabla 4.

Durante las primeras dos semanas desde la siembra de los esquejes enraizados (tiempo de adaptación) se realizó el riego 3 veces al día con un atomizador. Después de la tercera semana se realizó el riego normal dependiendo de las condiciones climáticas. Las fertilizaciones se hicieron a la par con el riego de acuerdo con las dosis empleadas comercialmente.

El ensayo se llevó a cabo entre los meses de Marzo y Julio de 1997 en el invernadero del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia; el intervalo de temperatura del ensayo osciló entre 20-25°C durante las 8 y 17 horas.

Inoculación del patógeno y tratamientos

Se inocularon 10 ml de la suspensión conidial de FOD (1×10^6 microconidias/ml) a los esquejes enraizados. La inoculación se efectuó individualmente mediante el riego directo del patógeno sobre las raíces, 48 horas después de las aplica-

Tabla 4. Tratamientos para ensayo in vivo.

	Tratamientos	Planta (cantidad)
B	sin FOD (Blanco)	Clavel (5)
T 1	con FOD (control)	Clavel (5)
T 2	con <i>R. leguminosarum</i> y FOD	Clavel (5)

ción de 15 ml de la suspensión (3.0×10^8 células/ml) de *R. leguminosarum*.

Parámetros a evaluar (12)

El ensayo tuvo una duración de 14 semanas desde la inoculación de FOD. Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Incidencia = (Número de plantas enfermas por tratamiento / Número de plantas totales por tratamiento) x 100
- Severidad = (Promedio de Índice de enfermedad por tratamiento / 4 (la escala máxima)) x 100
- Índice de la enfermedad (5)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los primeros retos en el presente trabajo fue el de encontrar un medio que permitiera el crecimiento tanto de *R. leguminosarum* como del hongo FOD. El medio LMA - PDA permitió el adecuado desarrollo de ambos microorganismos sin alteración del crecimiento normal. En

este medio el *R. leguminosarum* se desarrolló tal como lo hace en el medio LMA con una formación moderada de goma, observándose incoloro o blanco translúcido. Así mismo en este medio (LMA-PDA), el hongo FOD creció abundante, algodonoso y con un tinte púrpura o violeta intenso, en forma similar a como lo hace en el medio PDA.

Se establecieron las condiciones adecuadas para los ensayos duales de la interacción de *R. leguminosarum* - FOD principalmente en cuanto a temperatura, tiempo de incubación y medio de cultivo.

Determinación del efecto biocontrol de *R. leguminosarum* sobre *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi*

Ensayo dual en microcultivo

Para este ensayo, la observación óptima fue a las 48 horas después de la incubación donde se observaron fraccionamientos y discontinuidad en las estructuras de las hifas.



Fotografía 1. Fotografías microscópicas (10x25, 10x40) de Ensayo dual *R. Leguminosarum* - FOD en microcultivo.

En la Fotografía 1 se pueden apreciar las hifas fraccionadas (lisis) donde se encontró gran cantidad de las bacterias (*R. leguminosarum*) mientras que las hifas que no estuvieron en contacto con *R. leguminosarum* fueron continuas. Este resultado coincide con los estudios de Tú (8) y de Malajckuk y Pearce (13) quienes observaron el desarrollo de *Rhizobium* en forma parásita sobre las hifas del hongo patógeno (*Phytophthora*) acompañado de la lisis en las hifas por *R. Japonicum* y algunos rizobios como WU 337, WU 400, WU 386 etc.

Después de 48 horas de incubación se hizo difícil la observación por microscopio del efecto de *R. leguminosarum* sobre FOD porque el micelio denso y las hifas no permitieron observar claramente el efecto.

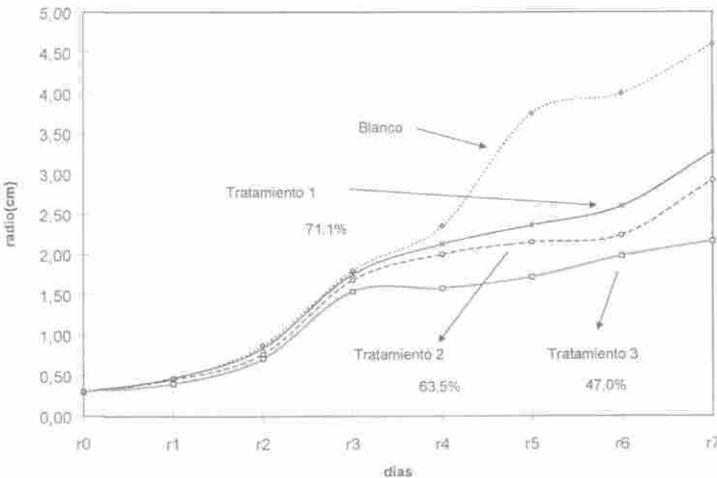
La presencia de *R. leguminosarum* no fue benéfica para el crecimiento normal de las hifas de FOD. Es probable que al-

gunas sustancias fungitóxicas o un conjunto de sustancias segregadas por el *R. leguminosarum* interrumpieran el ciclo de vida de FOD. Esta observación coincide con el estudio de Chakraborty y Purkayashita (7) quienes aseguraron que el *Rhizobium* puede proteger las raíces de leguminosas y no leguminosas del ataque de hongos patógenicos, produciendo algunos metabolitos tóxicos como rhizobiotoxina y/o antibióticos (6).

Ensayo dual in vitro

Como se observa en la gráfica 1, a partir de los 4 días de incubación se observaron diferencias en el crecimiento radial entre los tratamientos 1, 2 y 3 comparado con el blanco 1-2-3. Estas diferencias de crecimiento radial fueron máximas cuando se cumplieron 168 horas (7 días) de incubación.

Para el tratamiento 1 el promedio del crecimiento radial respecto al crecimiento radial normal a los 7 días de incubación



Gráfica 1. Crecimiento radial de FOD en los tratamientos 1, 2 y 3.

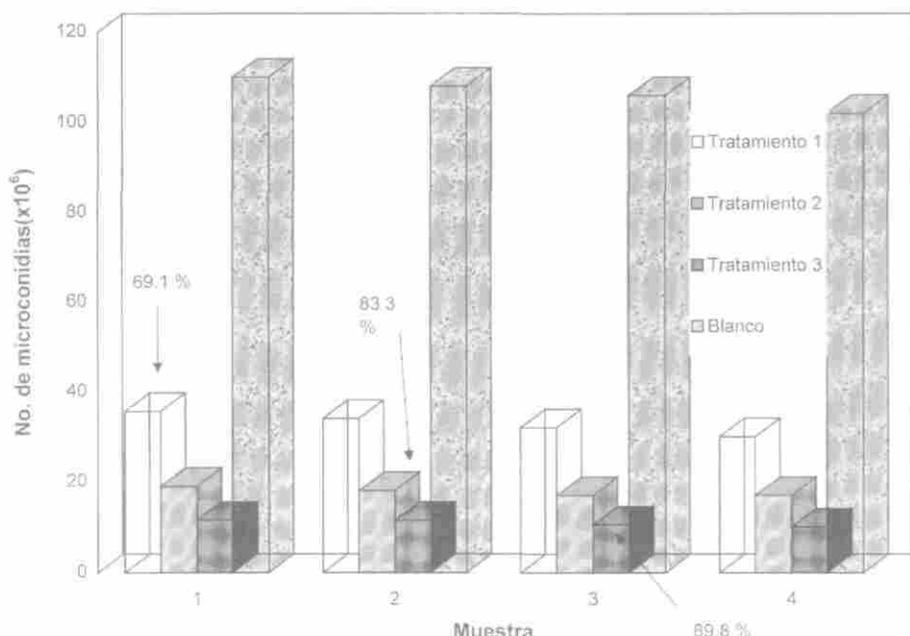
fue 71.1% (3.27cm/4.60 cm), para el tratamiento 2 fue 63.5% (2.92 cm/4.60 cm) y para el tratamiento 3 fue 47.0% (2.16 cm/4.60 cm). Además, mientras mayor fue la dosis de *R. leguminosarum* (tratamientos 2 y 3), mayor fue la inhibición en el desarrollo del patógeno (FOD).

Debido a que el desarrollo fúngico no fue completamente radial, se hizo necesario utilizar otro parámetro de medición más objetivo, como el recuento de microconidias y realizar posteriormente los tratamientos estadísticos. En las suspensiones conidiales de 7 días de incubación, se encontró abundante cantidad de microconidias, pocas macroconidias y ausencia de clamidosporas en todas las muestras. Como se puede apreciar en la Gráfica 2, las cantidades de microconidias en todos los tratamientos (1, 2 y 3)

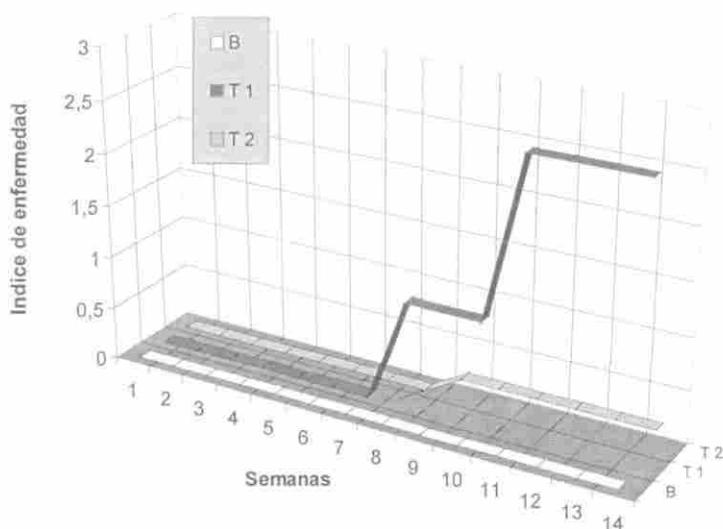
fueron notablemente menores que las del blanco correspondiente (blancos 1-2-3).

El análisis de varianza de un solo factor ($\alpha=0.05$) para este modelo (variación de concentración de *R. leguminosarum*) mostró que los tratamientos 1, 2, 3 y su blanco respectivo (blanco 1-2-3) fueron distintos causando una reducción significativa de estructuras reproductivas (microconidias) de FOD. La comparación de los tratamientos con el control (prueba de Dunnett, $\alpha=0.05$) confirmó que todas las dosis aplicadas fueron válidas para reducir la cantidad de microconidias de FOD.

En los ensayos duales in vitro, cuando se varió la concentración de *R. leguminosarum* frente al mismo número de microconidias de FOD, se observó una reducción estadísticamente significativa en el número



Gráfica 2. Comparación de la cantidad de microconidias FOD en los tratamientos 1, 2 y 3.



Gráfica 3. Desarrollo de la enfermedad en ensayo in vivo.

ro de microconidias hasta de un 90 % y una disminución del crecimiento radial de micelio de FOD en un 71 %, respecto a su blanco.

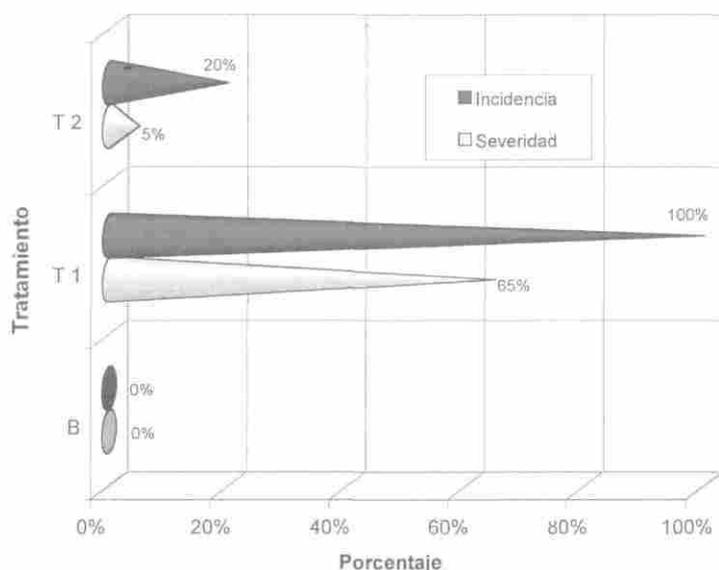
La cepa B de *R. leguminosarum* como organismo biocontrolador mostró una actividad antifúngica comparable con la de otros biocontroladores como en el caso de algunos aislamientos de *Rhizobium* reportados por Malajczuk y Pearce (13) los cuales ocasionaron una lisis en las hifas de *Phytophthora cinnamoni* superior al 80 % comparado con su respectivo control.

Ensayo in vivo

La prueba de esterilidad dio resultados negativos para la presencia de FOD en la arena tratada y por lo tanto este ensayo in vivo se inició libre del patógeno.

Bajo estas condiciones, la variedad Raggio di sole, susceptible a la raza 2 de FOD y altamente comercial, mostró los síntomas típicos de marchitamiento vascular causado por FOD. Al realizar un corte transversal de tallo al final del experimento, se observó la presencia de un halo marrón en los haces vasculares de la planta enferma.

Los primeros síntomas aparecieron a partir de la octava semana (56 días) después de la inoculación de FOD en los tratamientos T1 y T2. Todos los tratamientos anteriormente mencionados mantuvieron constantes sus índices de la enfermedad durante las últimas 3-4 semanas de evaluación como se observa en la Gráfica 3. Efectivamente hubo un control biológico por parte de *R. leguminosarum* reduciendo notablemente los síntomas de



Gráfica 4. Evaluación de la enfermedad en el ensayo in vivo.

la enfermedad causada por FOD. En T1 el índice de la enfermedad se disparó notablemente (de 1 a 2.6) a partir de la decimaprimer semana.

De acuerdo con la evaluación final llevada a cabo en la decimacuarta semana (98 días), el índice de la enfermedad se redujo hasta un 92% (T2) con respecto a T1. Los resultados del análisis de varianza en el diseño de bloques completos aleatorizados indican que los tratamientos (T1 y T2) no se comportaron de la misma manera con un nivel de significancia del 5%.

La presencia de *R. leguminosarum* (T2) redujo el índice de la enfermedad y se observó que hubo un retraso de 1 semana en la manifestación de los síntomas característicos, con respecto al tratamiento T1.

La presencia de *R. leguminosarum* de acuerdo con la Gráfica 4, ocasionó una reducción en la incidencia de la enfermedad a menos del 20% y con una severidad no mayor de 5% comparado con el tratamiento T1.

De acuerdo con los resultados de los ensayos in vitro (una reducción de microconidias hasta 90% con 7 días de incubación) e in vivo (redujo la incidencia hasta 20% con una severidad de 5% durante 14 semanas), la cepa B del *R. leguminosarum* fue un agente de control biológico para FOD en forma similar al encontrado en otros trabajos.

Finalmente, se concluye que la cepa B del *R. leguminosarum*, además de ser un organismo fijador de nitrógeno presentó actividad biocontroladora contra FOD. Este agente biocontrolador no es riesgoso

al liberarlo en los suelos ya que dicha bacteria no presenta peligro sobre el clavel y otras plantas, por el contrario, sería muy benéfica liberarla en suelos pobres en nitrógeno.

En la búsqueda de nuevas tecnologías para el agro y de acuerdo con la tendencia mundial de fin del siglo XX, el *R. leguminosarum* cepa B constituye una opción más como biocontrolador de FOD el cual ataca a uno de los cultivos comerciales de importancia como el clavel. Además podría ocasionar efectos colaterales beneficiosos como la disminución tanto en el uso de fungicidas para el control del patógeno, como de costos en producción y reducción de la contaminación del medio ambiente particularmente en suelos y aguas.

AGRADECIMIENTOS

Presentamos nuestros más sinceros agradecimientos a los Departamentos de Química y de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARBELÁEZ, G. Control of *F.ox.* and *Phialophora cinerescens* on carnation by combined oil treatment and application of antagonists. *Acta Horticulturae* **1987**. 216, 77-81
2. CARVAJAL, L. M. Contribución al estudio de la fisiología del hongo *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi*. Tesis de Pregrado, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá. **1988**.
3. OSUNA, A. R. Contribución al control del marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* en plantas de clavel con cepas de *Trichoderma* sp.bajo condiciones de campo, Tesis de Pregrado, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, **1996**. 8-41
4. BAYEEN, R.P.; ELGERSMA, D.M. Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *F.ox. f.sp. dianthi*. *Netherlands Journal of plant Pathology*. **1985**. 91, 119-135
5. ARBELÁEZ, G.; CALDERÓN, O.L. Determinación de razas fisiológicas de *F. oxy. f.sp. dianthi* del clavel en Colombia. *Agronomía Colombiana*. **1992**. 8, 243-247
6. MALAJCZUK, N. Microbial Antagonism To Pytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, And Pathology. *American Phytopathological Society*. In D.C. Erwin et.al. (eds). **1983**. 197-218.
7. CHAKRABORTY, U.; PURKAYASHTA, R.P. Role Of Rhizobitoxine In Protecting Soybean Roots From *Marcrophomina phaseolina* Infection . *Can. J. Plant Pathol.* **1984**. 8. 140-146.
8. TU, J.C. Protection Of Soybean From Severe *Phytophthora* Root Rot By *Rhizobium*, *Physiological Plant Pathology*, **1978**. 12. 233-240.
9. DE NAVARRO, Y. N.; PÉREZ G. Comparación de algunas propiedades de las lectinas de semilla y de raíz de

- Haba. Revista Colombiana de Química. **1990**. 19. 1. 35-50.
10. LEE PARK CHEOL WOO; DE NAVARRO, Y. N. Estudio del Eventual Efecto Biocontrol de *Rhizobium leguminosarum* y Lectina de Arveja (*Pisum sativum*) sobre *Fusarium oxysporum* f.sp.dianthi. Tesis de Pregrado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, **1998**. 20-44
 11. Clinical laboratory. 11 th edition of Medicine- chemical Investigation Methods, E. Merck, Darmstadt, Federal Republic of Germany. **1970**. 12-13
 12. GARCÍA, G.P.; LOZANO, P.A. Evaluación de dos aislamiento de *Trichoderma* spp, (T17 y T18) como control de *Fusarium oxysporum* f.sp.dianthi en un cultivo de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Tesis de Pregrado, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. **1996**. 30-31.
 13. MALAJCZUK, N.; PEARCE, M. Interactions Between *Phytophthora Cinnamomi* And *Rhizobium* Isolates. Trans. Br. Mycol. Soc., **1984**. 82. 491-500.