

AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp. Y ACTINOMYCETES A PARTIR DE SUELOS DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*) Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD ANTAGÓNICA *in vitro* SOBRE *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*

Isolation of *Trichoderma* sp. and Actinomycetes from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) Soil and Evaluation *in vitro* of their Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*

Marcela Márquez¹, María Mercedes Martínez² y Marcela Franco²

RESUMEN

Uno de los problemas más limitantes en el cultivo de clavel en Colombia es el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Foxd) el método empleado actualmente para controlar y/o prevenir esta enfermedad es la aplicación de fungicidas, los cuáles no son tan efectivos como se espera y al emplearse en exceso causan daños al medio ambiente. Por lo tanto el uso de poblaciones microbianas nativas para controlar esta enfermedad se perfila como una alternativa importante en los programas de erradicación de la enfermedad. Algunas especies de *Trichoderma* y de Actinomycetes, se han estudiado, por la capacidad de producir sustancias inhibitorias del crecimiento y/o la actividad de este fitopatógeno. En este estudio se aislaron diversas cepas de estos microorganismos controladores y se evaluó *in vitro* su actividad antagónica.

Se aislaron seis cepas de *Trichoderma* y treinta de Actinomycetes a partir de la rizósfera de diferentes cultivos de clavel de la Sabana de Bogotá; la inhibición del crecimiento de Foxd fue evaluada *in vitro* por medio de la interacción hongo-hongo y actinomicete-hongo al medir el porcentaje de inhibición micelial (%MI) y la formación de un halo de inhibición alrededor del crecimiento de Foxd. Los aislamientos de *Trichoderma* sp y Actinomycetes mostraron un %MI mayor al 50%. El aislamiento VI de *Trichoderma* sp (T-VI) presentó un %MI del 89% mientras que el aislamiento VII de Actinomycetes (A-VII, identificado como *Streptomyces* sp) alcanzó un %MI del 91%, un halo de inhibición mayor a 1cm. Posteriormente, fue imposible determinar la actividad antagónica en asociación entre los aislamientos T-VI y A-VII debido al efecto inhibitorio de *Streptomyces* sp sobre *Trichoderma* sp.

Palabras claves: marchitamiento vascular, control biológico, antagonismo, porcentaje de inhibición micelial

SUMMARY

One of the major problems of the carnation crop in Colombia is the vascular wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Foxd).

Since the only method currently used to control and/or prevent the disease is the application of fungicides, which are not as effective as expected and when used in excess causing a severe environmental damage, the alternative of using native microbial populations for the control is a very interesting perspective. Among these biological agents, *Trichoderma* sp. and some actinomycetes have been studied due to their ability to produce substances that inhibit the growth and/or activity of this phytopathogen. In this study several strains of both kinds of biological agents were isolated and tested for antagonistic activity *in vitro*.

Six *Trichoderma* sp strains and thirty different actinomycetes were isolated from soils of three carnation crops farms of the Bogota Plateau. Inhibition of Foxd growth was evaluated *in vitro* by measuring the mycelium inhibition rate (%MI) and the inhibition zone of Foxd growing in contact with the putative antagonists in fungi-fungi and fungi-actinomycete interactions. We found that all *Trichoderma* sp and actinomycetes isolates exhibited an %MI greater than 50%. Isolate VI of *Trichoderma* sp (TVI) reached an %MI as high as 89% while isolate VII of actinomycetes (AVII, later identified as *Streptomyces* sp) reached an %MI of 91% with an inhibition zone greater than 1 cm.

Furthermore, it was impossible to determine the associated antagonistic activity of TVI and AVII isolates cultured together because the latter inhibited the growth of the former.

Key words: vascular wilt disease, biological control, antagonism, mycelium inhibition rate.

¹ Estudiante de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. D. C

² Profesor Facultad de Ciencias Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. D.C franco@javercol.javeriana.edu.co

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades introducidas al país en los últimos 25 años relacionados con el cultivo del clavel se encuentra el marchitamiento vascular producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Pril. & Del.) Snyd. & Hans. Esta enfermedad es una de las más limitantes por su fácil propagación a partir de material infectado y por su alta persistencia en el suelo. La aplicación de vapor al suelo y algunos fumigantes (Metán-sodio, Basamid®, metilsotiocianato, entre otros), son empleados con frecuencia para el manejo de esta enfermedad la cual es una de las más limitantes por su fácil propagación a partir de material infectado y por su alta persistencia en el suelo (Arbeláez, 1993b).

Los residuos tóxicos productos del uso continuo de pesticidas, afectan la salud de los trabajadores y deterioran el ambiente; como medida complementaria, se ha planteado el uso del control biológico, buscando la reducción de la actividad del inóculo o actividades de un patógeno, mediante la acción natural de uno o más microorganismos o sustancias microbianas, a través de la manipulación del ambiente, huésped o antagonistas o por una introducción masiva de uno o más microorganismos (Baker y Cook 1982). Para el control de *F. oxysporum* se han empleado diversos hongos y bacterias; entre estos se encuentran *F. oxysporum* no patógeno (Rattink, 1992), *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* (Ochoa, 1996) y otros actinomicetes capaces de producir un amplio espectro de antibióticos y sustancias fungistáticas, como enzimas degradadoras de la pared de los hongos (Yuan y Crawford 1995) y *Trichoderma harzianum*, el cual es el agente fúngico controlador más estudiado y empleado en el control de otros fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora cinnamomi* (Arbeláez, 1993c, Elias Arcos y Arbeláez, 1993).

Con el fin de conocer la capacidad antifúngica que presentan *Trichoderma* sp. y algunos actinomicetes sobre *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*; en este trabajo, se evaluó por medio de tres técnicas la actividad antagonista de estos microorganismos aislados de la rizósfera de clavel (*Dianthus caryophyllus*) de la Sabana de Bogotá; mediante pruebas in vitro individualmente y en asociación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de Suelos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, en colaboración con el laboratorio de la corporación CorpoGen, en Bogotá, D.C. Colombia.

Muestreo

Se realizaron muestreos aleatorios de suelos rizosféricos

y de plantas que presentaran síntomas característicos del marchitamiento vascular, en cultivos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en fincas de la Sabana de Bogotá, las cuales fueron transportadas en bolsas y refrigeradas a 4° C hasta el momento de su procesamiento.

Aislamiento e identificación

Trichoderma sp. y Actinomicetes: El aislamiento de dichas cepas se realizó a partir de las muestras de suelo procedentes de tres fincas productoras de clavel de la Sabana de Bogotá, utilizando el método de dilución en placa (Sylvia et al, 1998). A partir de muestras compuestas teniendo en cuenta la finca y la variedad, se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1 %, para el aislamiento de los microorganismos se emplearon dos medios: agar papa dextrosa (PDA) pH 5,5 para *Trichoderma* sp y agar avena pH 6,8 suplementado con nistatina al 0,1% (Franco, 1999) para el aislamiento de los actinomicetes; incubando a temperatura ambiente durante ocho días.

Posterior al aislamiento, se efectuó el reconocimiento de los hongos aislados para identificar su género y especie por medio del estudio de sus características microscópicas y macroscópicas según las claves de Barnett (1995). Para la identificación de las cepas de actinomicetes se realizaron análisis macroscópicos de las colonias, Tinciones de Gram y pruebas bioquímicas (Cross, 1989).

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi*: El aislamiento del fitopatógeno se realizó a partir del material vegetal sintomático recolectado el cual se desinfectó en una solución 1:10 de hipoclorito de sodio por un minuto, posteriormente se lavaron con abundante agua destilada estéril para retirar el exceso del germicida, a continuación se realizaron cortes que se transfirieron a un tubo con caldo papa dextrosa (CPD) pH 5,5, se llevaron a incubar 6-8 días a temperatura ambiente. De los tubos que presentaron crecimiento micelial, se transfirió una pequeña porción de éste al agar PDA acidificado (Dimock, 1948 citado por Pizano, 1987), para demostrar la idoneidad del cultivo se realizó el reconocimiento de estructuras macroscópicas y microscópicas (Barnett, 1995) y para identificar su raza fisiológica, se realizó una PCR siguiendo el protocolo y los iniciadores Fus 6 y ARJM 1.2 (específicos para la raza II, la cual es la más predominante en Colombia y en el mundo) descritos por Anzola y Rojas (2000).

Pruebas de Antagonismo in vitro

Para establecer la capacidad inhibitoria de los diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp. y Actinomicetes sobre *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, se efectuaron pruebas en agar PDA por triplicado, durante 8 días, para la evaluación se empleó la técnica de enfrentamiento.

La interacción Hongo-Hongo se evaluó por medio de la técnica de enfrentamiento por medio de cultivo dual

(Pinzón et al, 1999), en agar PDA pH 5,5 a una distancia de 7 cm entre sí y se incubaron a temperatura ambiente; para evaluar la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp. se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (% MI) del patógeno, para calcular éste se empleó el modelo matemático utilizado por Pérez et al. (2000), (Figura 1).

$$\% M_I = (M_B - M_A / M_B) \times 100$$

%M_I: Porcentaje de inhibición micelial
M_A: Crecimiento micelial influenciado
M_B: Crecimiento micelial libre (Control de crecimiento)

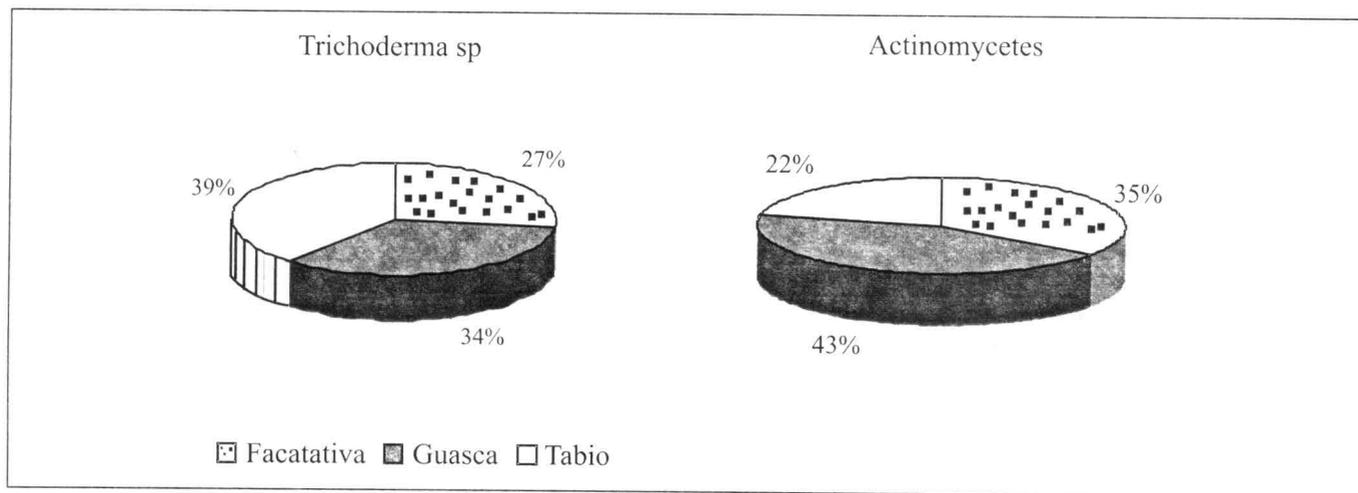
Figura 1. Porcentaje de inhibición micelial.

Para determinar la interacción Actinomycete-Hongo se realizaron pruebas de antagonismo en agar PDA pH 6,8, con incubación a 28°C durante 8 días utilizando dos técnicas diferentes: Inicialmente la técnica descrita por Igarashi et al. (1997) en la cual se realizó un masivo del actinomycete a 3 cm del borde formando un cuadrante,

en el centro de éste por medio de punción se inoculó al fitopatógeno, posteriormente la técnica empleada por Gómez y Ortega (1993), en la cual el actinomycete se inoculó en una línea vertical atravesando todo el diámetro de la caja y en las extremidades (a 1 cm del borde de la caja) por punción se inoculó al fitopatógeno. Después de determinar la actividad antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. dianthi de los aislamientos de Actinomycetes; se evaluó con las técnicas anteriores la actividad del mejor actinomycete frente al aislamiento de *Trichoderma* sp. que presentó mejor actividad antagonista frente al fitopatógeno. Inicialmente, para aceptar al actinomycete como antagonista se evaluaron los criterios de selección de cada una de las técnicas: en Igarashi se evaluó el crecimiento del patógeno el cual debía ser menor o igual a 1cm y en la técnica de Gómez y Ortega la presencia de un halo de inhibición alrededor del patógeno; posteriormente se determinó el % MI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de los microorganismos: las muestras de suelo demostraron una población variada de acuerdo con la finca, la cual se observa en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Porcentaje de la población encontrada en los suelos rizosféricos de clavel.

Esta variedad coincide con el estudio realizado por Garcés de Granada et al. (1999), en el cual se establece el potencial de los suelos colombianos para albergar diversas especies de hongos especialmente *Trichoderma* sp. esto se observó de igual forma en este estudio, debido a la variedad en la población de hongos (*Trichoderma* sp) y bacterias como los actinomycetes con capacidad antagonista contra diversos hongos, la presencia de estos microorganismos controladores en suelos afectados por el Marchitamiento Vascular, se puede inferir que éstos son suelos con capacidad supresiva, la cual se encuentra vinculada con la actividad microbiana del suelo que es

de origen nativo y presenta condiciones adversas para el desarrollo de un determinado fitopatógeno por medio de micostasis, competencia microbiana o factores antibióticos (Camargo y Sanabria, 1993).

De las diferentes muestras de suelo se aislaron seis cepas de *Trichoderma* sp; las cuales se identificaron de acuerdo a sus características macroscópicas de crecimiento rápido en PDA, textura pulverulenta de color blanco que se torna a un verde olivo a través del tiempo y sin pigmento difusible en el medio y microscópicas por sus hifas con pocos septos, conidióforos erectos con ramificaciones a

lado y lado de las hifas; estas ramificaciones presentaban forma de botella (fiálides), conidias pequeñas globosas hialinas; (Barnett, 1995); igualmente se recuperaron 30 cepas de actinomycetes que se identificaron de acuerdo con sus características macroscópicas de consistencia firme y adherencia fuertemente al sustrato con aspecto pulverulento, olor a suelo húmedo y la presencia de exo y endo-pigmentación (Veldkamp 1978, citado por Franco, 1999) y sus características microscópicas bacterias Gram positivas que forman racimos de filamentos (hifas) y sus conidias las cuales podían estar solas, en parejas cadenas cortas o largas (Cross, 1989).

A partir de los esquejes sintomáticos, se obtuvieron dos cepas las cuales de acuerdo a sus características macroscópicas de crecimiento algodonoso de color blanco a durazno y pigmentación púrpura del medio y a la formación de sus macroconidias en forma de hoz se identificaron como *F. oxysporum* f. sp. dianthi; posteriormente se realizó una PCR con el fin de identificar la raza fisiológica de cada uno de los aislamientos. Los iniciadores empleados fueron diseñados por Anzola y Rojas (2000) a partir de un fragmento de 2600pb el cual presenta homología con el gen que codifica para la enzima α -L-arabinofumorosidasa (secuencias reportadas en el NCBI Gen Bank), los cuales son específicos para la raza II, de acuerdo con los estudios realizados por Arbeláez, (1992) y Barrera *et al.* (1997). Esta raza predomina en los cultivos de clavel de la Sabana de Bogotá; la cepa Fox I, amplificó con dichos iniciadores indicando que este corresponde a *F. oxysporum* f. sp. dianthi raza II y fue la cepa empleada en las pruebas in vitro (Figura 2).

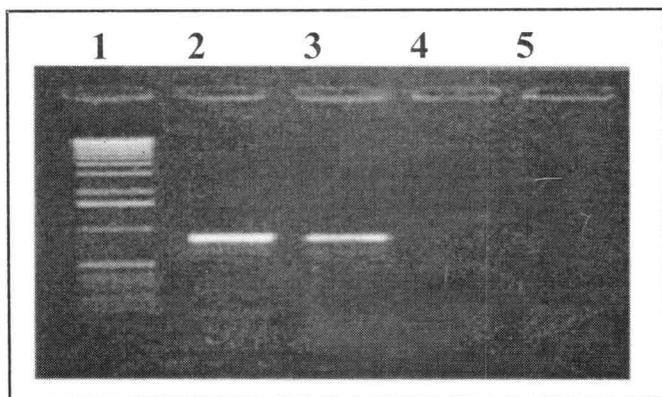


Figura 2. Determinación de la raza fisiológica de *Fusarium oxysporum* por medio de PCR Carril 1. 1 kb DNA ladder, 2. Control Positivo pMosBlue 2600pb, 3. Fox I, 4. Fox II, 5) Control negativo.

Las pruebas de antagonismo in vitro con los seis aislamientos de *Trichoderma* sp. demuestran la actividad controladora de este hongo sobre el patógeno (Fox I), coincide con lo observado en diferentes estudios, ya sea por medio de micoparasitismo (Pérez et al, 2000), antibiosis (Mitchell, 1992), u otros mecanismos de control (Angulo et al, 1992, Elías, 1993, entre otros.). Estadísticamente se encontraron diferencias significativas

en relación con el %MI entre las cepas ($p = 0.031$), aunque las diferentes cepas presentaron un %MI³ al 50% y en algunas se observó esporulación sobre el patógeno lo cual indica una posible actividad micoparasítica, y/o como consecuencia de su mayor tasa de crecimiento micelial con relación a la del patógeno y por lo tanto a su mayor capacidad de colonización del sustrato; sin embargo el mayor antagonismo se presentó con la cepa T-VI la cual disminuyó el crecimiento del patógeno en un 89 %MI y a su vez se observó una zona clara (posible halo de inhibición) alrededor de Fox-I, por la producción de alguna sustancia antifúngica; los resultados de estas pruebas se observan en la Tabla 1 y Figura 3.

Tabla 1. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* sp sobre *F. oxysporum* f. sp. dianthi.

Cepa	M _B	M _A	T	H	E	%M _I
T-I	6.4cm	2cm	5,7cm	0	+	68
T-II	6.4cm	1,6cm	5,2cm	0	+	75
T-III	6.4cm	2,4cm	4,4cm	0	-	62
T-IV	6.4cm	2,8cm	3,7cm	0	-	56
T-V	6.4cm	2,7cm	4,7cm	0,9cm	-	59
T-VI	6.4cm	0.7cm	5.2cm	1cm	-	89

MA Crecimiento micelial influenciado. MB. Crecimiento micelial libre (Control) T. *Trichoderma* H: Halo E. Esporulación sobre el patógeno.

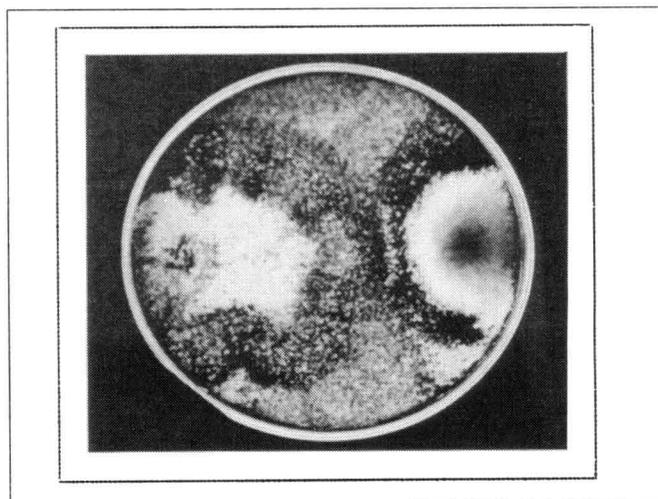


Figura 3. Antagonismo entre T-VI vs Fox-I después de ocho días de incubación.

En las pruebas para determinar la capacidad antagónica de los Actinomycetes, con la técnica de Igarashi se observó la actividad antagónica de siete aislamientos esto se determinó por el crecimiento del patógeno menor o igual a 1 cm y el %MI fue mayor al 80% estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las cepas ($p=0.304$); no obstante con la técnica de Gómez y Ortega, el número de aislamientos con capacidad antagónica se

disminuyó a cinco cepas las cuales se seleccionaron por presentar un halo de inhibición alrededor del fitopatógeno y un %MI mayor al 50% en esta técnica si se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.001$), de acuerdo con los resultados de las dos técnicas se escogió la cepa A-VII por presentar %MI del 91% (Igarashi) y 72% y un halo de 1.2 cm (Gómez y Ortega) (Tabla 2 y Figura 4), posteriormente se identificó como *Streptomyces* sp por medio de pruebas bioquímicas. Los resultados de estas pruebas demuestran la capacidad antagonista de diversas especies y aislamientos de actinomicetes, la cual se ha observado en diferentes estudios, como los realizados por Lahdemperä (1987) en Finlandia, quien

demostró la variada actividad antagonista de diversas especies y aislamientos de *Streptomyces* en el control de *F. oxysporum* f. sp. dianthi. La especie antagonista más efectiva, de acuerdo con este estudio, fue el aislamiento de *Streptomyces griseoviridis*, comercializado con el nombre de Mycostop®, y ha presentando resultados satisfactorios en el control del marchitamiento vascular del clavel, en cultivos comerciales en varios países de Europa; de igual forma, Molano (2000) y Franco (1999) quienes según el aislamiento utilizado, establecieron la capacidad antagonista de éstos sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi.

Tabla 2. Antagonismo in vitro de los Actinomicetes sobre *F. oxysporum* f. sp. dianthi.

IGARASHI					GOMEZ & ORTEGA			
Cepa		M _A	%M _I	E	H (cm)	M _A	% M _I	E
A VII	<1	0.6	91		1.2	1.8	72	
A VIII	<1	0.67	89		0	3.5		+
A XII	>1	1.15		+	0.35	2.65	58	
A XIII	>1	2.5		+	0.83	2.17	66	
A XVI	1	1	84		0	3.5		+
A XIX	>1	1.83		+	0.25	2.78	56	
A XX	1	0.93	85		0	3.6		+
A XXI	1	1	84		0	2	68	
A XXII	1	1	84		0	3.2		+
A XXVII	<1	0.83	87		0.78	2.3	64	-
M _B = 6.4cm					M _B = 6.4cm			

M_A. Crecimiento micelial influenciado M_B. Crecimiento micelial libre (Control) T, H: Halo E. Esporulación sobre el antagonista

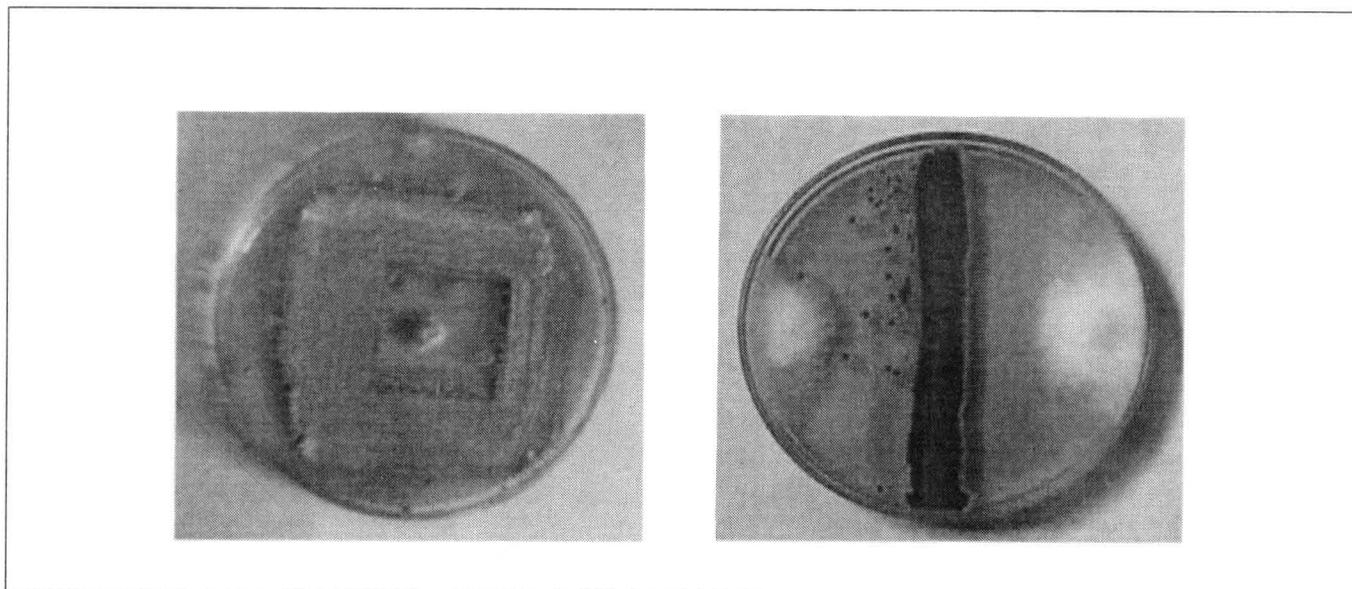


Figura 4. Antagonismo entre A-VII vs Fox-I después de ocho días de incubación a. Igarashi, b. Gómez y Ortega

Al realizar la asociación entre la mejor cepa de Actinomicete (A-VII) con el mejor antagonista de *Trichoderma* sp. (T-VI), para potenciar el efecto controlador sobre el fitopatógeno, los resultados de ésta no

fueron satisfactorios (Figura 5) debido a que la sustancia antifúngica producida por *Streptomyces* sp. inhibió el crecimiento y desarrollo del aislamiento de *Trichoderma* sp. debido a que se observó un halo de inhibición

mayor a 1 cm (Gómez y Ortega) y un crecimiento de ésta menor a 1 cm (Igarashi); este efecto inhibitorio fue observado de igual manera por Ochoa (1996) al enfrentar a *Streptomyces coelicolor* frente a *Trichoderma hamatum*; sin embargo, en estas pruebas se observó que el efecto inhibitorio producido por el antibiótico

secretado por *S. coelicolor* duró únicamente 5 días y a partir del sexto, *T. hamatum* pudo crecer sobre la zona de inhibición, lo cual no se presentó al enfrentar los antagonistas A-VII contra T-VI, impidiendo realizar una asociación para lograr potenciar la inhibición de *Foxd*.

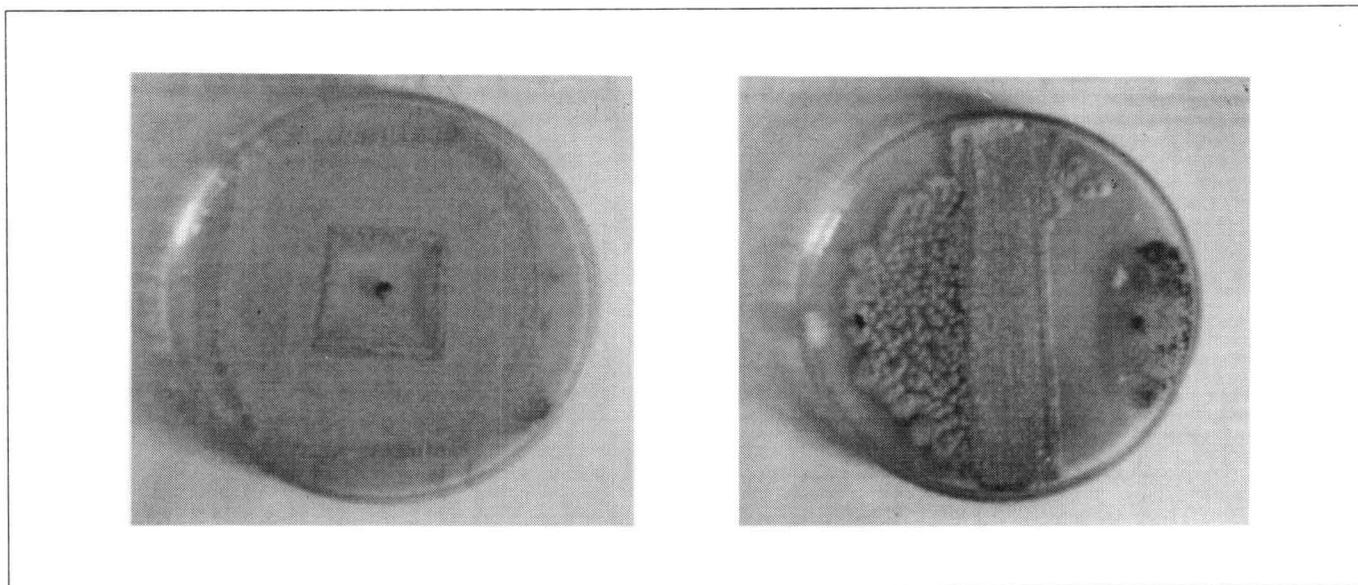


Figura 5. Antagonismo entre A-VII del Actinomicete y T-VI de *Trichoderma* sp después de 8 días de incubación a. Igarashi, b. Gomez y Ortega.

Posteriormente, para corroborar la capacidad antagonica ejercido por *Streptomyces* sp. y *Trichoderma* sp. *in vitro* sobre *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* se plantea trabajar bajo condiciones normales en invernaderos de cultivos de clavel, afectados por el marchitamiento vascular, empleando los microorganismos antagonistas directamente como inoculantes para tratar de establecer su adaptación ecológica y efecto antagonico sobre el fitopatogeno.

LITERATURA CITADA

- ANZOLA, J. M y ROJAS, A. 2000. Caracterización de un fragmento de 2600 pares de bases obtenido como marcador molecular de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y su utilidad en el diagnostico molecular de este patogeno. Tesis de grado para optar al titulo de Biólogo. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Universidad Nacional...Bogotá D.C.
- ARBELÁEZ, G. y CALDERÓN, O. L. 1992. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* on carnation of Colombia *Acta Horticulturae*, 307: 43-49.
- ARBELÁEZ, G. 1993A. Las enfermedades vasculares del clavel en Colombia y en el mundo *Agronomía Colombiana*. 10: 12-18.
- ARBELÁEZ, G. 1993B. La floricultura colombiana de exportación. *Agronomía Colombiana*. 10: 5-11.
- ARBELÁEZ, G.; GUZMÁN, S.; LEÓN, J.; GONZÁLEZ, M., MOLINA, J.C.;PARRA, J.; ANGULO, J.F. & ALVAREZ, J. D. 1993c. Control integrado del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Agronomía Colombiana*. 10: 68-89.
- BAKER, R. & COOK, J. 1982. Biological control of plant pathogens. American Phytopathological society. USA.
- BARNETT, H. L. 1995. Ilustrae genera of imperfect fungi the Saccardo system of classification. 3ed. Minnesota. p. 78-86 143-145.
- BARRERA, A. GÓMEZ, S y ARBELÁEZ, G. 1997. Determinación de razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en ocho fincas del "grupo Chía" cultivadoras de clavel, localizadas en la sabana de Bogotá. *Fitopatología Colombiana* 21:53-59.

- CAMARGO, O. Y. SANABRIA, J. 1993. Estudio de algunos aspectos epidemiológicos del Marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* y dinámica de las poblaciones del hongo en el suelo de un cultivo comercial de clavel. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional. Bogotá D.C.
- CROSS, T. 1989. The Actinomycetes II: Growth and examination of Actinomycetes. en S. T. Williams, M. E. Sharpe y G. G. Holt (Eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol.4. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 2340-2347.
- ELÍAS, R; ARCOS, O y ARBELÁEZ, G.. 1993. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Agronomía Colombiana. 10: 52-61.
- FRANCO, M. 1999. Aislamiento, caracterización y evaluación de Actinomycetes inhibidores de algunos hongos fitopatógenos, En Maestría de Microbiología, Universidad Nacional. Bogotá D.C
- GARCÉS DE GRANADA E.; OROZCO, M. y ZAPATA, C. 1999. Fitopatología en flores, Acta Biológica Colombiana, 4:5-26.
- GÓMEZ, S y ORTEGA, L.M. 1993. Evaluación de *Streptomyces griseoviridis* (MYCOSTOP®), en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, en dos variedades de clavel estándar bajo condiciones comerciales. Ingeniero Agrónomo En: Departamento de Agronomía. Universidad Nacional.
- IGARASHI, M.; KINOSHITA, N. IKEDA, T.; NAKAGAWA, E.; HAMMADA, M & TAKEUCHI, T. 1997. Resomycin a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. The Journal of Antibiotics 57:71-79.
- LAHDENPERÄ., M. L. 1987 The control of *Fusarium* wilt on carnation with *Streptomyces* preparation Acta Horticulturae 216:85-91.
- MITCHELL, R. 1992. Environmental microbiology, Edt Wiley-Liss, New York. p. 336-350.
- MOLANO, A. F. 2000. Evaluación y selección de un medio de cultivo para la obtención de un antifúngico a partir de *Nocardia gardneri*. Mosquera-Colombia. Tesis de grado para optar al título de Microbiólogo. Facultad de Ciencias Básicas, departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
- OCHOA, J. M. 1996. Control biológico del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* mediante el uso de los microorganismos potencialmente antagonistas *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum* Tesis de grado para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D. C.
- PÉREZ, L. F., RAMÍREZ, C.A.; MARTÍNEZ, M.M. y ALGECIRA, N. 2000. Efecto de las variables condiciones de fermentación y el sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*, Tesis de grado para optar al título de Microbiólogo Industrial. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D. C.
- PINZÓN, L.; SALGADO, R. y MARTÍNEZ, G. 1999. Antagonismo entre diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y *Fusarium oxysporum*. f. sp. *dianthi* (Pril. & Del.) Snyd. & Hans. Fitopatología Colombiana. 23: 7-11
- PIZANO, M. 1987. Prueba de esquejes de clavel para detectar enfermedades vasculares y en particular *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.
- RATTINK, H. 1992. Biological control of *Fusarium* wilt disease of carnation by a non pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*, Acta Horticulturae 307:37-42.
- SYLVIA, D. FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; y ZUBERER, D. 1998. Principles and applications of soil microbiology, Edt Prentice Hall. New Jersey.
- YUAN, W. M y CRAWFORD, D. L. 1999. Characterisation of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as potential agent against fungal root and seed rots. Applied. Environmental Microbiology, 61:3119-3128.