

Microorganismos rizosféricos, potenciales antagonistas de *Fusarium* sp. causante de la pudrición radicular de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims)

Rhizosphere microorganisms potential antagonists *Fusarium* sp. causing root rot of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)

Luisa Fernanda Quiroga-Rojas^{1,2}, Nataly Ruiz-Quiñones¹, Guerly Muñoz-Motta¹,
y María Denis Lozano-Tovar^{1,2*}

¹Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). ²Centro de Investigación Nataima. Km 9 Vía Espinal-Ibagué. Tolima, Colombia. *Autor para correspondencia: mlozano@corpoica.org.co

Rec.: 23.08.11 Acept.: 30.08.12

Resumen

El cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis*), de gran importancia económica para Colombia, actualmente es afectado por la enfermedad del marchitamiento vascular causado por *Fusarium* sp. lo que hace necesario la búsqueda de alternativas que permitan un control eficiente de esta enfermedad. Aislados de las bacterias *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. y el hongo *Trichoderma* spp., fueron evaluados como potenciales biocontroladores de *Fusarium* sp. en pruebas in vitro e in vivo. Las pruebas de “test dual” evidenciaron que un aislado nativo de *Trichoderma* sp. y un producto comercial (*Trichoderma lignorum*), provocaron la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. entre 94.2% y 93.6%, respectivamente. La evaluación de aislados de *Trichoderma* sobre plántulas de maracuyá en tres momentos de aplicación indicó que la inoculación previa disminuyó el porcentaje de infección de las plantas entre un 75 y 50%, mientras que con aplicaciones después o simultáneamente con el patógeno, el porcentaje de infección disminuyó en 25%. Estos resultados indican que la aplicación de organismos de biocontrol en semillas pregerminadas mejora la protección de las plantas contra el fitopatógeno estudiado y son un recurso importante en el manejo preventivo de las enfermedades de maracuyá.

Palabras clave: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., biocontrol, *Passiflora edulis*, *Trichoderma* spp.

Abstract

The passion fruit crop (*Passiflora edulis*) is very important for the Colombian economy. Nowadays this crop is affected by damping-off disease caused by *Fusarium* sp. So, it is necessary to look for alternatives which allow us to control the disease efficiently. The bacteria *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. and the fungi *Trichoderma* spp., were evaluated as a *Fusarium* sp. potential biocontrol in In vitro and In vivo test. The research was carried out in laboratory and nursery. The “dual test” showed that an wild isolate of *Trichoderma* spp. and a commercial product (*Trichoderma lignorum*), inhibited the mycelial growth of *Fusarium* sp. between 94.2 and 93.6 % respectively. *Trichoderma* assessment on passion fruit plantlets at three application times demonstrated that applying *Trichoderma* before *Fusarium* sp. appearance, decreased the disease occurrence between 75.0 and 50.0 %, whereas applying *Trichoderma* after or simultaneously with the pathogen the disease in the plantlets decreased until 25.0 %. This suggest that inoculation of pregerminated seeds with bio-control agents improved the protection of plants against the pathogenic and they are an important tool for management of diseases in plants of maracuyá.

Key words: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., biocontrol, *Passiflora edulis*, *Trichoderma* spp.

Introducción

La producción de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) en Colombia ocupa un lugar importante en la explotación frutícola. Entre los departamentos de mayor producción se encuentra Huila con un área sembrada de 1635 ha. No obstante, una problemática fitosanitaria en el cultivo es el marchitamiento vascular conocido como secadera o muerte descendente de la planta ocasionado por *Fusarium* spp., que se caracteriza por el amarillamiento parcial de las hojas, enanismo de los brotes, disminución del crecimiento de la planta y por tanto pérdida de la producción (Lozano-Tovar *et al.*, 2008).

Las cepas patogénicas de *Fusarium* muestran un alto nivel de especificidad en sus hospederos y se reconocen alrededor de 120 formas especiales (Armstrong y Armstrong, 1981). El manejo de este patógeno se hace principalmente mediante fungicidas de amplio espectro como bromuro de metilo (Fravel *et al.*, 2003). Sin embargo, estas estrategias de control químico han generado la emergencia de cepas resistentes, además de efectos negativos en la salud pública y el medio ambiente. Esta problemática permite plantear el uso de estrategias de control biológico, importantes para la recuperación del equilibrio de los agroecosistemas y para el aprovechamiento del potencial antagonista natural de ciertos microorganismos como hongos y rizobacterias contra patógenos vulnerables (Avendaño *et al.*, 2006).

Entre los microorganismos más usados en el control biológico se encuentran los géneros *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (González *et al.*, 2004). *Trichoderma* es un hongo benéfico de vida libre, encontrado comúnmente en el suelo y asociado a las raíces de las plantas. Es avirulento, capaz de producir antibióticos y enzimas líticas como celulasas, hemicelulasas, xilasas y quitinasas de interés industrial para la protección de cultivos (Harman *et al.*, 2004).

Las especies de *Trichoderma* pueden ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente, compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de

las plantas y sus mecanismos de defensa; también pueden realizar el biocontrol directamente, mediante micoparasitismo. Estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada y su importancia en los procesos de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, el hongo al que antagoniza, del tipo de cultivo y de condiciones ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, el pH y la temperatura (Benítez *et al.*, 2004; Porras, 2000).

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia son denominadas rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), desempeñan funciones clave para la planta, tales como control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o inducción de resistencia sistémica, incremento de la biodisponibilidad de los elementos minerales como la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno o la fitoestimulación, producción de antibióticos, degradación de fitotóxicos y la producción de sideróforos (Mantilla, 2007).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar microorganismos rizosféricos como potenciales antagonistas de *Fusarium* spp., causante de la pudrición radicular de maracuyá en el departamento del Huila, en la cual se incluyeron los géneros de las bacterias *Azotobacter*, *Azospirillum* y especies del hongo *Trichoderma*.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de Suelos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), sede Nataima, ubicada en Espinal, departamento del Tolima (Colombia).

Material biológico

Se empleó el aislado 054 de *Fusarium* sp. obtenido de plantas enfermas de maracuyá, seleccionado como altamente patogénico en pruebas previas (Ruiz *et al.*, 2010) y caracterizado molecularmente (Sandoval-Lozano *et al.*, 2010). Para su crecimiento se utilizó medio PDA (papa dextrosa agar) a pH 5.5 - 6,0. Los microorganismos benéficos *Azotobacter* spp. (aislados 015 y 028) y *Azospirillum* spp. (aislados 002 y 023) fueron obtenidos de la

rizósfera de plantas sanas de maracuyá y seleccionados por su capacidad de producción de ácido indolacético (Muñoz y Lozano-Tovar, 2007). Para el género *Trichoderma* se utilizaron tres aislados nativos (Tr001, Tr002 y Tr003), obtenidos de suelos de los municipios de Algeciras y Rivera del departamento del Huila (Muñoz y Lozano-Tovar, 2007), dos productos comerciales (*T. lignorum* y *T. harzianum*) y un producto preformulado (*Trichoderma* sp.). Para el crecimiento de los antagonistas se utilizaron medios específicos Ashby para *Azotobacter* spp., NFB semisólido para *Azospirillum* spp. (Bashan, 1998) y agar-jugo V-8 para *Trichoderma*. Las semillas de maracuyá fueron obtenidas comercialmente de la empresa Semillas del Pacífico con registro ICA 00581.

Actividad antagónica in vitro de aislados de *Trichoderma* spp. frente a un aislado de *Fusarium* sp.

Esta prueba fue realizada en placas Petri con PDA. Para el efecto, a 1 cm del borde de la placa se colocó un disco de 5 mm de diámetro con crecimiento del fitopatógeno de 8 días de edad y de manera equidistante, en forma opuesta se colocó un disco de *Trichoderma* spp. de 6 días de edad. Se empleó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial del *Fusarium* sp., el cual se determinó mediante la ecuación: $%IC = (CC - CF)/CC * 100$, donde *CC* = diámetro de la colonia de *Fusarium* sp. creciendo sin la presencia de antagonistas y *CF* = diámetro de la colonia del fitopatógeno creciendo en presencia del antagonista (Avendaño *et al.*, 2006). La capacidad antagónica se determinó mediante la escala propuesta por Bell *et al.* (1982) de 0 a 4, donde: 0 = ausencia de invasión de la superficie del patógeno y 4 = invasión total de la superficie del patógeno y esporulación sobre ella.

Efecto de extractos crudos de antagonistas sobre la germinación de conidios de *Fusarium* sp.

Los aislados de *Trichoderma* se cultivaron en 500 ml de caldo V8-pH 6, el cual fue incubado durante 6 días a 140 r.p.m. y 28 °C. Los aislados de *Azotobacter* spp. y *Azospirillum*

spp. se cultivaron en 250 ml de medio NFB modificado (Haahtela *et al.*, 1981) y fueron incubados durante 48 h a 140 r.p.m. a 28 °C. Las biomásas fúngica y bacteriana se separaron por centrifugación a 3000 r.p.m. por 15 min, el sobrenadante se filtró en papel Waltman® 40 y a través de una membrana de celulosa Millipore® de 0.22 µm. Sobre placas de agar se dispuso 1 ml de los filtrados, posteriormente se sembraron 100 µl de una suspensión de 1×10^5 conidios/ml de *Fusarium* sp. en puntos determinados previamente.

Para el control se utilizaron 100 µl de agua destilada estéril. Los tratamientos fueron distribuidos bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Se evaluó el porcentaje de inhibición de germinación (%IG), el cual se determinó después de 7 h de iniciados los tratamientos, contando 100 esporas (germinadas o no), mediante la ecuación: $%IG = ((GC - GF)/GC) * 100$, donde *GC* = Germinación esporas del tratamiento control, *GF* = Germinación esporas del fitopatógeno tratado con el filtrado.

Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el desarrollo de la pudrición radicular en plantas inoculadas con *Fusarium* sp. en casa de malla

Los aislados nativos (Tr001, Tr002 y Tr003) se cultivaron en placas con PDA e incubados durante 96 h. Las esporas se cosecharon en agua destilada estéril y la concentración se ajustó con cámara de Neubauer a 1×10^6 conidios/ml, los productos comerciales y el preformulado de *Trichoderma* fueron aplicados de acuerdo con la recomendación técnica del uso del producto.

El aislado de *Fusarium* sp. se multiplicó en rodajas de papa (*Solanum tuberosum*) y se incubó durante seis días a 28 °C, la concentración para la inoculación de las plantas fue ajustada a 1×10^6 conidios/ml (Ruiz *et al.*, 2010).

Se utilizaron semillas comerciales de maracuyá (*Passiflora edulis*) que fueron sembradas en sustrato 1:1:2 (cascarilla de arroz quemada: cascarilla de arroz sin quemar:suelo) esterilizado en autoclave a 15 psi durante una hora por dos días consecutivos. Se evaluaron tres momentos o tiempos de aplicación de los biocontroladores, así: **momento 1:** patógeno

aplicado ocho días después de la inoculación del antagonista; **momento 2:** inoculación del patógeno y del antagonista al mismo tiempo; y **momento 3:** aplicación de patógeno ocho días antes del antagonista. Se utilizaron tres controles de la forma siguiente: químico (48% p/v de Mefenoxam, equivalente a 465 g/l de Metalaxil-M; negativo o blanco consistente en plántulas sin inóculos; y positivo o plántulas inoculadas con solo el fitopatógeno. Las observaciones sobre el desarrollo de la enfermedad se hicieron durante cuatro meses, registrando la sintomatología externa de ésta y la mortalidad de las plantas. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones. A todas las plántulas se les realizó un corte superficial con un bisturí en el cuello de la raíz en el momento de la inoculación del patógeno.

Evaluación de la aplicación de microorganismos antagonísticos en semillas pregerminadas y sembradas en sustrato inoculado con *Fusarium sp.*

Las semillas de maracuyá fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.8% por un minuto y lavadas tres veces con agua estéril. Luego fueron colocadas en agua por 24 h para su pregerminación. Los microorganismos antagonísticos *Azotobacter spp.* (015 y 028), *Azospirillum spp.* (002 y 023), *Trichoderma sp.* (Tr003) fueron cultivados en medios específicos (Ashby, NFB semi-sólido y Jugo V8). El inóculo de *Fusarium sp.* fue obtenido mediante la metodología anteriormente mencionada. Se utilizó una concentración de 1×10^6 conidios/ml para el caso de *Trichoderma spp.* y *Fusarium sp.* La concentración de los aislamientos bacterianos se ajustó por colorimetría a 600×10^6 UFC/

ml (Sutton, 2011). Se evaluaron dos momentos de aplicación: **momento 1:** inoculación previa de los antagonistas a la semilla pregerminada y siembra de éstas 48 h después de la aplicación del patógeno en el sustrato; **momento 2:** inoculación de los antagonistas a las semillas pregerminadas y siembra ocho días antes de la aplicación del fitopatógeno en el sustrato. Las observaciones del desarrollo de la enfermedad se hicieron durante cuatro meses, registrando la sintomatología externa y la mortalidad de las plantas. El ensayo se realizó con un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Se establecieron, además, tres controles, como se describió anteriormente.

Análisis de resultados

Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza y se establecieron diferencias de medias con la prueba de rango múltiple Tukey al 95% ($P < 0.05$), utilizando el programa Statistix 8 (2008).

Resultados y discusión

Actividad antagonística de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium sp.*

La evaluación de la actividad antagonística mostró diferencias entre los tratamientos ($P < 0.001$); donde el aislamiento Tr003 y el producto comercial *T. lignorum* presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* con 94.2 y 93.6%, respectivamente. Según la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), el aislamiento nativo Tr003 fue calificado como clase 4, ya que invadió totalmente la superficie del patógeno y esporuló sobre él (Cuadro 1). Avendaño *et al.* (2006) en pruebas de antagonismo

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* en cultivos de plato dual con *Trichoderma spp.* y valoración según la escala de Bell *et al.* (1982).

Tratamiento	Inhibición (%)	Calificación (Escala de Bell <i>et al.</i> , 1982)
aisladoTr003	94.2 a*	3.5 a
<i>T. lignorum</i>	93.6 a	3.3 ab
<i>T. harzianum</i>	79.4 b	2.8 abc
aisladoTr001	78.7 b	3.0 abc
aisladoTr002	77.4 b	2.3 bc
Pre-formulado	73.6 b	2.0 c

* Valores con letras iguales en columnas no presentan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

in vitro con *Trichoderma* spp. encontraron igualmente inhibiciones del crecimiento de *F. oxysporum* con invasión total del micelio del patógeno siete días después de la aplicación. Según Tovar (2008) aislamientos de *Trichoderma* spp. inhibieron el crecimiento de *R. solani* hasta 63.67% después de 72 h. Según Melo y Faull (2000) *T. harzianum* y *T. koningii* inhibieron entre el 79-82% del crecimiento micelial de *R. solani*, demostrando diferentes mecanismos de acción donde *T. harzianum* parasita y destruye el micelio de *R. solani* y *T. konningii* produce cantidades considerables de antibióticos.

Evaluación del efecto de extractos crudos de antagonistas sobre la germinación de conidios de *Fusarium* sp.

Se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($P < 0.001$), existiendo diferencias entre todos los microorganismos frente al control y diferencias entre antagonistas (Figura 1). El producto comercial *T. lignorum* y el aislamiento nativo de *Trichoderma* sp. (Tr003) presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la germinación de conidios de *Fusarium* sp., con 44.7 y 40.7%, respectivamente; mientras que la inhibición observada con los extractos de los aislados de *Azotobacter* y *Azospirillum* fue inferior a 20% (Figura 1). La inhibición de la germinación puede ocurrir por la variedad

de enzimas que produce *Trichoderma* spp. como glucanasas, quitinasas, exonucleasas, proteasas, además de otros metabolitos altamente tóxicos como ácido harziánico, alamentinas, peptaiboles, antibióticos, 6-pentil- α -pirona, viridina, gliovirina, glisoperinas, ácido hepteldico, entre otros (Benítez *et al.*, 2004). Según Michel *et al.* (2005) cepas de *Trichoderma* producen quitinasas y glucanasas e inhiben el potencial reproductivo de conidios de *F. oxysporum* hasta en 95% e inhiben el crecimiento micelial en 34%.

Efecto de *Trichoderma* spp. en el desarrollo de la pudrición radicular en plantas de maracuyá inoculadas con *Fusarium* sp.

En el estudio realizado en casa de mallas, la inoculación previa presentó diferencias ($P = 0.0003$) entre los tratamientos. Los aislamientos nativos Tr002 y Tr003 de *Trichoderma* disminuyeron la infección de las plantas entre un 75 y 50%, respectivamente. No obstante, cuando se aplicaron simultáneamente con el patógeno la reducción de la infección solo fue de 25% y cuando se aplicaron ocho días después de la inoculación del patógeno no se observó reducción de la enfermedad. Los productos de *Trichoderma* sp. (preformulado) y *T. lignorum* presentaron 100% de infecciones en todos los momentos de aplicación (Cuadro 2), lo que indica que algunas cepas del hongo *Trichoder-*

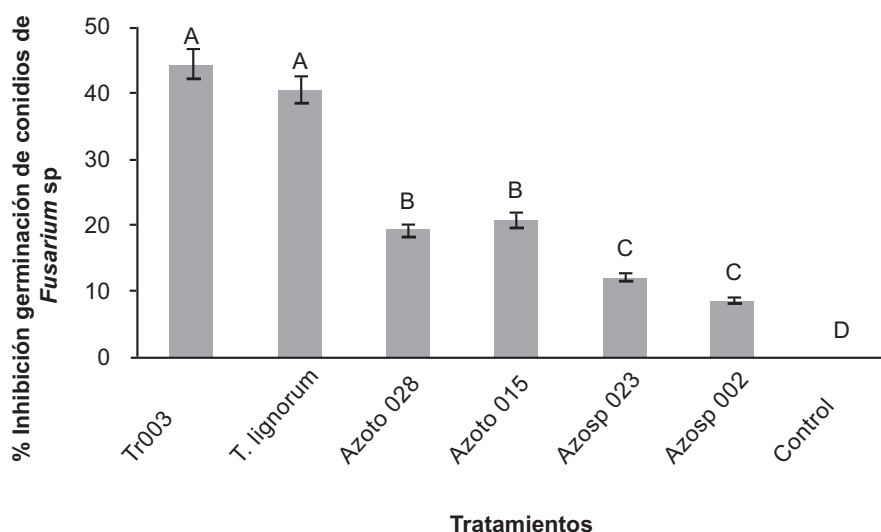


Figura 1. Efecto de extractos crudos de microorganismos antagónicos sobre la germinación de conidios de *Fusarium* sp. Valores con letras iguales no presentan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey al 95% ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Porcentaje de plantas de maracuyá afectadas por *Fusarium* sp. cuatro meses después de la inoculación del patógeno y la aplicación de los diferentes tratamientos (aislados y momentos de aplicación).

Tratamientos	Momentos de aplicación de <i>Trichoderma</i> spp.		
	Inoculación previa de <i>Trichoderma</i> spp. (% infección)	Inoculación de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Fusarium</i> sp. al mismo tiempo (% infección)	Inoculación previa de <i>Fusarium</i> spp. (% infección)
Control positivo	100.0 a*	100.0 b	100.0 b
<i>Trichoderma</i> sp. (preformulado)	100.0 a	100.0 b	100.0 b
<i>T. lignorum</i>	100.0 a	100.0 b	100.0 b
<i>T. harzianum</i>	75.0 ab	100.0 b	75.0 b
Tr001	75.0 ab	75.0 b	100.0 b
Tr003	50.0 ab	100.0 b	100.0 b
Tr002	25.0 ab	75.0 b	100.0 b
Control blanco	0.0 b	0.0 a	0.0 a
Control químico	0.0 b	75.0 b	50.0 ab

* Valores con letras iguales en columnas no presentan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey al 95% (P < 0.05).

ma disminuyen la enfermedad sólo cuando se aplican en forma preventiva. Hernández *et al.* (1999) encontraron resultados similares a los del presente estudio cuando evaluaron momentos de aplicación de *T. harzianum* para el control de *Dothiorella* sp., obteniendo el mejor resultado cuando el antagonista fue aplicado 24 h antes que el patógeno.

Evaluación de la aplicación de microorganismos antagónicos en semillas pregerminadas de maracuyá sembradas en sustratos inoculados con *Fusarium* sp.

Cuando las semillas pregerminadas de maracuyá fueron tratadas con *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. y *Trichoderma* spp., ocho días

antes de la inoculación con *Fusarium* sp., se presentaron diferencias entre los tratamientos (P < 0.0001), siendo los tratamientos con *Trichoderma* iguales estadísticamente al blanco, así como el aislado 015 de *Azotobacter* y el aislado 002 de *Azospirillum*. La mayor eficiencia se logró con *Trichoderma* (Tr003 y *T. lignorum*), que alcanzaron 100% de protección (Cuadro 3).

Cuando los antagonísticos fueron aplicados a las semillas 48 h después de la inoculación del patógeno se presentaron diferencias entre tratamientos (P < 0.0001), así los aislados de *Trichoderma* fueron diferentes del control positivo e iguales al blanco. Su protección frente a la enfermedad fue de 75 y 87.5 % (Cuadro

Cuadro 3. Porcentajes de plantas afectadas por *Fusarium* sp. cuatro meses después de aplicado el patógeno y los aislados de *Trichoderma* spp., *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp. en semillas pregerminadas de maracuyá.

Tratamientos	Momentos de aplicación	
	Semillas tratadas con microorganismos antagónicos ocho días antes de la inoculación de <i>Fusarium</i> sp. (% infección)	Semillas tratadas con <i>Fusarium</i> sp. 48 horas antes de la aplicación de los microorganismos antagónicos (% infección)
Control positivo	100.0 a*	100.0 a
<i>Azospirillum</i> 023	50.0 ab	87.5 ab
<i>Azotobacter</i> 028	50.0 ab	75.0 abc
<i>Azotobacter</i> 015	37.5 b	50.0 abc
Control químico	25.0 b	50.0 abc
<i>Azospirillum</i> 002	12.5 b	62.5 abc
Blanco	0.0 b	0.0 d
Tr003	0.0 b	12.5 cd
<i>Trichoderma lignorum</i>	0.0 b	25.0 bcd

* Valores con letras iguales en columnas no presentan diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey al 95% (P < 0.05).

3), mientras que los tratamientos con rizobacterias y el control químico fueron similares al control positivo y su protección varió entre 12.5 y 50% (Cuadro 3). González *et al.* (2004) observaron que la aplicación de *T. harzianum* en semillas de melón redujo la incidencia de *F. oxysporum* entre 37.5 y 46.3%. Rincón (1991) demostró el efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *R. solani* en semilleros de café, y obtuvo una reducción de 55% en la incidencia de la enfermedad cuando inoculó el sustrato con el hongo antagonista. Betancourt (1997) realizó un estudio empleando la cepa de *Trichoderma* Th003 frente al fitopatógeno *F. oxysporum* en semillas de tomate en preemergencia y observó que el porcentaje de protección fue del 66.94% vs. el control.

Conclusiones

- Las interacciones que tienen lugar en la rizósfera son muy complejas, es necesario profundizar en su conocimiento para poder establecer estrategias que permitan un manejo más eficiente de los sistemas agrícolas.
- Los resultados de este trabajo indican la importancia de la colonización previa de la rizósfera por organismos benéficos como estrategia de manejo integrado de enfermedades radicales en plantas, al evidenciarse el efecto de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. disminuyendo el porcentaje de infección de las plantas entre un 75 y 50%.

Agradecimientos

Esta investigación fue posible gracias a los recursos del Proyecto Manejo Preventivo de la Pudrición Radicular de Maracuyá en el Departamento del Huila, ejecutado por Corpoica y cofinanciado por la gobernación del Huila, Codecyt y Colciencias.

Referencias

Armstrong, G. M. y Armstrong, J. K. 1981. Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En: Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J. (eds.). *Fusarium: disease, biology, and taxonomy*. University Park, PA, EE.UU. State University Press. p. 391 - 399.

- Avendaño, C.; Arbeláez, G.; y Rondón, G. 2006. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* en frijol *Phaseolus vulgaris*, mediante la acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp., y *Pseudomona fluorescens*. *Agron. Col.* 24:62 - 67.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biot. Adv.* 16:729 - 770.
- Bell, D.; Well, H.; y Markham, C. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phyt.* 72:379 - 382.
- Benítez, T.; Rincón, A.; Limon, C.; y Codón, A. 2004. Review: Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *Intern. Microb.* 7:249 - 260.
- Betancourt, J. 1997. Evaluación de una técnica de pregerminación controlada en matriz sólida en combinación con los agentes de control biológico *Trichoderma koningii* y *Pseudomonas fluorescens* para el control del marchitamiento vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum*. Tesis de grado (Biología). Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias Biológicas. Bogotá. 148 p.
- Fravel, D.; Olivain, C.; y Alabouvette, C. 2003. Research review *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phyt.* 157:493 - 502.
- González, R.; Montealegre, J.; y Herrera, R. 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Pae-nibacillus lentimabus* y *Trichoderma* sp. *Ciencia e Investigación Agraria* 31:1 - 5
- Haahtela, K.; Wartiovaara, T.; Sundman V.; y Skujins, J. 1981. Root-Associated N₂ fixation (acetylene reduction) by enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold- climate Spodosols. *Applied Environ. Microb.* 41:203 - 206.
- Harman, G. E.; Lorito, M.; y Lynch, J. M. 2004. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate o remediate soil and water pollution. *Adv. Applied Microb.* 56:313 - 320.
- Hernández, J.; Arcia, M.; y Ramírez, R. 1999. Comparación in vitro del control químico y biológico de *Dothiorella* sp. causante de la pudrición apical de la guayaba (*Psidium guajava* L). *Rev. Fac. Agron.* 16:49 - 55.
- Lozano-Tovar, M. D.; Rozo, L. S.; Ruiz, N.; Quiroga, L. F.; y Sandoval-Lozano, L. A. 2008. Manual de manejo preventivo de la secadera (*Fusarium* sp.) en el cultivo de maracuyá. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica. 76 p.
- Mantilla, E. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoco ono) en periodo de enraizamiento. Colombia. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad

- de Ciencias. Microbiología Agrícola y Veterinaria. 127 p.
- Melo, I. y Faull, J. 2000. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. Sci. Agr. 57:1-8
- Michel, A.; Otero, M. A.; Rebolledo, O.; Lezama, R.; y Ochoa, M. 2005. Producción y efecto de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp. en la inhibición de *Fusarium subflutinans* in vitro. Rev. Chapingo Serie Horticultura 11:273 - 278.
- Muñoz, G. y Lozano-Tovar, M. D. 2007. Antagonistas en el manejo preventivo de la pudrición radicular en maracuyá. Informe de pasantía. Centro de Investigación Nataima. Corpoica. Espinal. 137 p.
- Porras, A. 2000. Evaluación de la actividad in vitro del género *Hypocrea* contra dos hongos fitopatógenos de importancia agrícola *Fusarium* sp. y *Miscena citricolor*. Costa rica, Tesis de grado Ingeniería Biotecnológica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Ingeniería en Biotecnología. 97 p.
- Rincón, G. 1991. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en semilleros de café con varios aislamientos de *Trichoderma* spp. Tesis de grado de Ingeniero agrónomo. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogota. 101 p.
- Ruiz, N.; Quiroga, L.; y Lozano-Tovar, M. D. 2010. Aislamiento del agente causal de la pudrición radicular del maracuyá y evaluación de alternativas para su control en Colombia. Fitop. Col. 34:1-4.
- Sandoval-Lozano, L. A.; Rodríguez, S.; Lozano-Tovar, M. D.; y González, C. 2010. Caracterización molecular de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas de maracuyá en el departamento del Huila. Tesis de grado. Ciencias. Universidad del Tolima. Ibagué. 121 p.
- Statistix 8. 2008. Analytical Software, Tallahassee, E.U.A.
- Sutton, S. 2011. Measurement of microbial cells by optical density. J. Validation Techn. 17:47 - 49.
- Tovar, J. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista in vivo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Tesis de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá. 81 p.