

Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijensis* Morelet a fermentos de raquis de plátano y fungicidas

In vitro sensitivity of *Mycosphaerella fijensis* Morelet to rachis ferments of plantain and fungicide

Yvo Hernández González^{1*}, Claudia Paredes Niño^{1*} y Harvey Cárdenas²

¹Universidad Nacional Experimental Sur del Lago "Jesús María Semprúm" (UNESUR). Laboratorio de Biotecnología de Santa Bárbara, estado Zulia. Venezuela.

²Centro Internacional del Plátano (CIPLAT). El Chivo, estado Zulia. Apdo. Postal 5101. Correos electrónicos: yvo333@hotmail.com*; paredes@unesur.edu.ve*

RESUMEN

La sigatoka negra es una de las enfermedades más dañina que ataca al cultivo del plátano. Con el propósito de evaluar la sensibilidad *in vitro* del hongo que la causa a extractos de raquis de plátano 'Hartón', se realizó un ensayo en la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR) y el Centro Internacional del Plátano (CIPLAT). Se prepararon medios agar-agua (16%) con los fermentados de raquis (2 y 4 meses) y dos fungicidas (benzimidazol y propiconazol), usando 6 placas de Petri por tratamiento y 5 muestras foliares enfermas de 2 cm² por placa, colocadas en cámara húmeda durante 48 horas e incubados por 1 hora a 26 °C en oscuridad. Se evaluó el número de esporas germinadas y no germinadas, número de hifas cortas, distorsionadas, largas y longitud de las hifas largas. A cada extracto se le determinó su composición química y mineral. Los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva realizando una prueba de comparación de medias (ANAVAR). Los resultados demostraron una falta de sensibilidad del hongo a los diferentes fungicidas químicos, mientras que en los fermentos se observó una mayor inhibición de la germinación o crecimiento del patógeno. El análisis químico de los extractos mostró la presencia de la mayoría de los nutrientes como el potasio, y de saponinas que pueden inhibir el crecimiento del patógeno; y de la mayoría de los nutrientes como el potasio. Por tanto, los fermentos de raquis de plátano pueden controlar a *Mycosphaerella fijensis* Morelet en condiciones *in vitro*, por lo que se debe evaluar su efectividad en condiciones de campo.

Palabras clave: sigatoka negra, plátano, resistencia, patógeno, eficiencia.

ABSTRACT

Black Sigatoka is one of the most damaging disease that attacks plantain cultivation. In order to evaluate the *in vitro* susceptibility of the fungus to horn plantain rachis ferments, a trial was conducted at the Universidad Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR) and the Centro Internacional del Plátano (CIPLAT), Venezuela. Media agar-water (16%) were prepared with rachis ferments, 2 and 4 months old, and two fungicides (propiconazole and benzimidazole), using six Petri dishes per treatment and five leaf samples of 2 cm² per dish, placed in a humid chamber for 48 hours, and incubated for 1 hour at 26 °C in darkness. Number of germinated and not germinated spores were counted, as well as, the number of short, distorted, long hyphae and length of long hyphae. It was determined the chemical and mineral composition of each extract. Data were analyzed using descriptive statistics making a comparison test of means (ANOVA). The results showed a lack of sensitivity of the fungus to different chemical fungicides used, while in the presence of ferments there was greater inhibition of germination and growth of the pathogen. Chemical analysis of the extracts showed the presence of most of nutrients, such as potassium, and saponins that can inhibit growth of the pathogen. These results demonstrated that the ferments of plantain rachis can control *Mycosphaerella fijensis* Morelet *in vitro* conditions, therefore their effectiveness should be evaluated under field conditions.

Key words: sigatoka negra, plantain, resistance, pathogen, efficiency.

INTRODUCCIÓN

La sigatoka negra, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijensis* Morelet (Nava, 1997; Pineda *et al.*, 1997), es catalogada como una de las enfermedades más serias que ataca al cultivo del plátano, siendo ésta, más virulenta que la sigatoka amarilla (Martínez *et al.*, 1997).

Entre los años 2010 y 2012, los últimos territorios libres en el mundo de sigatoka negra, ubicados en las islas del Caribe: Martinica, Dominicana y Guadalupe (Antillas francesas) fueron invadidos por la enfermedad, causando gran incertidumbre entre los productores y cerrando el círculo de una de las epifitas más importantes en la historia de las musáceas en el último siglo (Guzmán *et al.*, 2013).

La característica de mayor virulencia de la sigatoka negra, se manifiesta por una alta capacidad esporulativa, con ciclos reproductivos más cortos y elevada severidad, en las cuales el hongo penetra por los estomas de las mismas (Borges, 1971). El primer síntoma de la enfermedad en forma general, aparece en el haz del limbo en forma de manchas longitudinales de un color amarillo pálido o marrón oscuro en el envés del limbo de 1 a 2 mm de largo, que aumentan de tamaño formando lesiones necróticas con halos amarillos y centros gris claro, ocasionando una disminución en la producción por la violenta reducción del área foliar, y por consiguiente, de la capacidad fotosintética de las plantas (Martínez *et al.*, 1997).

Por tal razón, los productores han implementado programas de control más continuos y una mayor utilización de agroquímicos (Orosco *et al.*, 2013). Es evidente que mientras más aplicaciones de productos se realicen, incidirá negativamente en los costos de producción, mayor contaminación ambiental y posiblemente inducirá a la resistencia del hongo a estos biocidas (Madrigal y Ruess, 1998; Beveraggi *et al.*, 1995).

En los últimos años los productores de plátano en la zona sur del Lago de Maracaibo, han implementado de forma empírica técnicas para controlar esta enfermedad, como el uso de fermentos o exudados de la fermentación del raquis del mismo cultivo como un producto capaz de reducir el crecimiento del patógeno en la plantación. Dado que este exudado, aparentemente tiene

algún efecto fungicida contra la sigatoka negra, es utilizado en diferentes concentraciones y en combinaciones con otros fungicidas comerciales (Álvarez *et al.*, 2010).

Es por ello que, la presente investigación tiene como finalidad determinar bajo condiciones *in vitro*, el efecto y composición del exudado fermentado de raquis de plátano y fungicidas sobre el crecimiento del hongo causante de la enfermedad conocida como sigatoka negra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras foliares de plátano con sigatoka negra

En la plantación de plátano (*Musa* AAB cv. Hartón) ubicada en el Centro Internacional del Plátano (CIPLAT), en la población El Chivo, municipio José Javier Pulgar del estado Zulia, fueron colectadas muestras foliares infectadas con *M. fijensis*, grado 5-6 (Mateus *et al.*, 1987): tejido blanco a gris, libres de un período de precipitaciones de 2 días y aplicaciones de fungicidas de al menos 30 días, procedentes de plantas jóvenes con 8 a 10 hojas funcionales.

De las muestras de hojas se tomaron fragmentos en las áreas de avance de la enfermedad, sin escoger el tejido muerto por senescencia, muerte mecánica de la hoja u otro factor que no sea originado por el hongo causante de la sigatoka negra. Luego, con la ayuda de una lupa estereoscópica, se seleccionaron fragmentos que contuvieran pseudotecios maduros con capacidad esporulante, dejándolos secar a temperatura ambiente por 24 horas.

Cada fragmento se seccionó en cuadros de 2 x 2 cm y se dispuso de cinco cuadros de la muestra foliar en papel de filtro estéril, sosteniéndose con grapas la superficie adaxial expuesta, sin que los trozos quedaran muy cerca de los bordes del papel y colocándose en una cámara humedecida con agua destilada estéril por 48 horas (Mateus *et al.*, 1987).

Prueba de sensibilidad *in vitro*

La prueba de sensibilidad fue realizada en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad

Nacional Experimental Sur del Lago (UNESUR), latitud norte 8°51'50" y longitud este 71°35'24". Para ello se tomaron fermentos de raquis (realizados a través de tallos de plátanos cortados en cuatro o cinco partes), elaborados en el CIPLAT que tenían 2 y 4 meses de fermentación (E2 y E4), contenidos en tanques de agua con capacidad de 5.000 litros, y dos fungicidas comerciales a base de benzimidazol y propiconazol.

Los fermentos y fungicidas se dispensaron en placas de petri, agregándolos en un medio agar-agua al 16% previamente autoclavados a 120 °C por 20 min a 15 libras de presión en diferentes concentraciones 0,06; 0,12; 0,25; 0,5 y 1 ml l⁻¹ para los fermentos y 0,001; 0,01; 0,1; 1 y 5 mg l⁻¹ o ppm de ingrediente activo para los fungicidas, y un tratamiento testigo con tres repeticiones para cada uno, con un total de 21 tratamientos.

Las muestras foliares fueron sacadas de la cámara húmeda y colocadas en placas de petri con los diferentes tratamientos durante 1 h en incubación a 26 °C y en oscuridad, para lograr la descarga de las ascosporas. A cada placa se le determinó, a través de observaciones al microscopio óptico tipo Leica® a 40X, esporas germinadas y no germinadas.

De las germinadas se contabilizaron aquellas con tubos cortos, tubos largos y distorsionados, determinando solamente la longitud de las esporas con tubos largos en µm (Sepulveda y Arango, 2013).

Determinación de minerales y metabolitos secundarios

Con el propósito de determinar la composición mineral de los fermentos de raquis de plátano de E2 y E4, y de metabolitos secundarios que pudieran ejercer algún efecto inhibitor del crecimiento del hongo causante de la sigatoka negra, se realizaron dos análisis de laboratorio en la Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA).

El primero de los análisis se efectuó en el laboratorio de suelos, donde se cuantificaron los elementos fósforo (P) por colorimetría ultravioleta en solución vanadio-molíbdica; nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), manganeso (Mn)

y boro (B), por espectrofotometría de absorción atómica. La determinación de metabolitos secundarios, se realizó en el laboratorio de Microtécnica e Histología Vegetal, a través del método por cromatografía de capa fina (TLC).

Análisis estadístico

Los valores obtenidos fueron analizados a través del programa estadístico SAS, aplicando una estadística descriptiva ANAVAR, realizando pruebas de separación de medias Tukey ($P \leq 0,05$) a las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el tratamiento testigo se pueden observar diferencias altamente significativas con respecto a los demás tratamientos a base de fungicidas comerciales (Cuadro 1), lo cual demuestra que el medio realizado para el crecimiento del hongo fue adecuado. Asimismo, mostró un alto crecimiento en cuanto al número de esporas germinadas y a la longitud de sus tubos de hifas largas (más de 50 µm), formándose redes intrincadas de tubos, que en algunos campos del microscopio no permitían apreciar su número y longitud. No se detectaron tubos de hifas distorsionadas, ni esporas sin germinar.

Por su parte, para los tratamientos con fungicidas químicos, los resultados del análisis estadístico no evidenciaron diferencias significativas para la variable número de esporas germinadas, lo cual es indicativo de una clara pérdida de sensibilidad del hongo a las diferentes diluciones de los fungicidas utilizados, observándose que en todas las concentraciones se encontraron más de 40 esporas germinadas (promedio) por cada campo de observación. Sin embargo, en el grupo de fungicidas a base de benzimidazoles, se pudo detectar la presencia de más micelios de hifas largas que distorsionadas (Cuadro 1).

Los datos demuestran claramente que en condiciones *in vitro*, a pesar de que el análisis estadístico no mostró diferencias significativas, se observó una mayor resistencia del patógeno para este grupo de fungicidas; ya que, en concentraciones más bajas (0,01 y 0,001 ppm), aumentaron los valores de germinación y desarrollo del micelio del hongo.

Cuadro 1. Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijensis* en diferentes concentraciones de fungicidas.

Tratamiento	Número de esporas no germinadas	Número de esporas germinadas	Número de hifas cortas	Número de hifas largas	Número de hifas distorsionadas	Longitud de hifas largas (μm)
5 ppm Benc.	3	47 b	1	28	18	40,00 b
1 ppm Benc.	9	41 bc	0	27	14	27,22 c
0,1 ppm Benc.	1	49 b	3	36	10	23,33 c
0,01 ppm Benc.	2	48 b	0	43	0	46,29 b
0,001 ppm Benc.	0	50 b	0	50	0	50> a
5 ppm Prop.	0	50 b	49	0	1	0,00 e
1 ppm Prop.	0	50 b	0	50	0	18,10 d
0,1 ppm Prop.	0	50 b	49	0	1	0,00 e
0,01 ppm Prop.	7	43 bc	41	0	2	0,00 e
0,001 ppm Prop.	4	46 b	3	43	0	25,00 c
Testigo	0	50> a	0	50>	0	>50 a

Benc: bencimidazol; Prop: propiconazol. Letras distintas verticalmente indican diferencias significativas, prueba Tukey ($P \leq 0,05$).

En los tratamientos de mayor dilución del fungicida (0,01 y 0,001 ppm) y en los benzimidazoles, no se registró la presencia de hifas cortas o distorsionadas y pocas esporas no germinadas. De forma similar, en los tratamientos a base de propiconazol y a la misma concentración, pocas fueron las hifas cortas observadas.

Si en condiciones controladas del laboratorio, donde las esporas del hongo hacen contacto directo con los medios a base de fungicidas, se observó una resistencia del patógeno a estos biocidas, se podría inferir que el hongo tendría una mayor probabilidad de sobrevivencia en las plantaciones de plátano bajo un ambiente natural no controlado y con una eficiencia de aplicaciones de fungicidas cercanas al 100%. Además, la resistencia del hongo a biocidas, debido a la poca rotación de grupos químicos que actúan como fungicidas, aumenta en el transcurso de los años, lo que agrava más el problema. Lo anterior se ha reportado en banano, en el cual, aplicaciones de fungicidas a base de Triazol para el control de sigatoka negra, provoca la resistencia del hongo a este fungicida (Ruiz *et al.*, 2013).

Aunque no se encontró diferencias estadísticas para la variable esporas germinadas entre ambos grupos de fungicidas, los tratamientos a base de propiconazol presentaron mayor resistencia del hongo que en lo encontrado para los bencimidazoles, observándose que en los tratamientos con mayor concentración del fungicida (5,0 a 1,0 y 0,1 ppm), todas las esporas estaban germinadas y con pocos tubos distorsionados. No obstante, se hallaron tubos largos y cortos de longitud menor a los 30 μm . Efecto contrario para este mismo fungicida, se observó en las concentraciones más bajas, en la que se detectaron pocas esporas no germinadas. En el tratamiento con menor dilución del fungicida (0,001 ppm) de 46 esporas germinadas, 43 presentaban tubos largos.

En el caso de los fermentos (Cuadro 2), se pudo observar, que en general todos los tratamientos presentaron menor cantidad de esporas germinadas en el medio, si se comparan con los fungicidas químicos. Asimismo, en aquellos tratamientos, el fermento de raquis de plátano donde lograron germinar las esporas, en su mayoría presentaba tubos cortos y de longitudes menores a los 25 μm .

Cuadro 2. Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijensis* en diferentes concentraciones en fermentos de raquis de plátano.

Tratamiento	Número de esporas no germinadas	Número de esporas germinadas	Número hifas cortas	Número de hifas largas	Número de hifas distorsionadas	Longitud de hifas largas (µm)
1 ml l ⁻¹ E2	50	0 d	0	0	0	0,00 d
1 ml l ⁻¹ E4	50	0 d	0	0	0	0,00 d
0,5 ml l ⁻¹ E2	28	22 c	0	0	22	0,00 d
0,5 ml l ⁻¹ E4	25	25 c	22	0	3	0,00 d
0,25 ml l ⁻¹ E4	50	0 d	0	0	0	0,00 d
0,25 ml l ⁻¹ E2	50	0 d	0	0	0	0,00 d
0,12 ml l ⁻¹ E2	0	50 a	3	46	1	20,00 b
0,12 ml l ⁻¹ E4	50	0 d	0	0	0	0,00 d
0,06 ml l ⁻¹ E2	17	33 b	13	20	0	12,85 c
0,06 ml l ⁻¹ E4	28	22 c	22	0	0	9,65 c
Testigo	0	50> a	0	50>	0	>50 a

Letras distintas verticalmente indican diferencias significativas, prueba Tukey ($P \leq 0,05$). E2 y E4: extracto de 2 ó 4 meses de fermentación.

Se demuestra que para *M. fijensis*, la mayor capacidad de infección está relacionada a una mayor longitud del tubo germinativo de la hifa (Sepulveda y Arango, 2013), por lo cual, la presencia de tubos cortos es un indicativo de sensibilidad del hongo al ingrediente activo.

Los tratamientos a base del fermento de raquis de plátano de cuatro meses (E4) y dos meses (E2) de descomposición, conformaron un grupo estadísticamente igual para la variable esporas no germinadas en las diluciones 1 ml l⁻¹, 0,25 ml l⁻¹ y solo para la concentración 0,12 ml l⁻¹ en el E4, siendo los mejores tratamientos para la inhibición del crecimiento del hongo en condiciones *in vitro*.

Esto podría indicar que elaborar en la práctica los fermentos a base de raquis de plátano, se puede dejar durante 2 ó 4 meses de fermentación, para obtener exudados que garanticen mayor control del hongo en campo. También, es importante

considerar que en E2 se encontró mayor cantidad de saponinas (Cuadro 3), compuestos con propiedades antifúngicas que puedan garantizar una mayor efectividad del producto en campo contra el patógeno.

Otro de los aspectos que pudiera incrementar la efectividad del control contra la sigatoka negra, es la combinación de fungicidas químicos con los fermentos producidos de raquis de plátano. En banano por ejemplo, se logró el control efectivo contra la sigatoka negra, utilizando lixiviados del raquis de este cultivo (20 l ha⁻¹), más un fungicida protector (mancozeb, a razón de 0,8 i.a. kg ha⁻¹), comprobando que esta combinación tiene un impacto benéfico en el aspecto ambiental, al disminuir las dosis de los fungicidas sintéticos; y económico, por su fácil preparación y obtención con materia prima de la misma unidad de producción (Martínez *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Metabolitos secundarios presentes en muestras de fermentos de raquis de plátano con extractos de 2 (E2) y 4 (E4) meses de fermentación.

Metabolitos secundarios	E2	E4
Saponinas (mg ml ⁻¹)	39,38	21,33
Alcaloides (trazas)	Presentes	Presentes
Fenoles totales	No detectados	No detectados
Aceites esenciales	No detectados	No detectados

Metabolitos secundarios presentes en el exudado de raquis de plátano

Una de las razones por las cuales los fermentos a base de raquis de plátano podrían controlar o actuar como biocida para la enfermedad, es su composición química (Martínez *et al.*, 2013). Los resultados del análisis (Cuadro 3), muestran la presencia de saponinas en mayor cantidad en E2 que en E4.

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de terpenoides, tóxicos para las células, tienen propiedades parecidas a las del jabón; lo cual, puede romper las membranas celulares de las mismas (Lincoln y Zeiger, 2006). Por tanto, las saponinas pueden actuar negativamente en el desarrollo de hongos patógenos causantes de enfermedades como la sigatoka negra (Martínez *et al.*, 2013).

En cultivos como el trigo y el zapallo, aplicando 100 ppm de fermentos de saponinas obtenidas de la planta *Quillaja saponaria*, se logró controlar hongos patógenos como Oidios en un 43%, tanto como en las aplicaciones de fungicidas químicos a base de propiconazol y azoxystrobinum (Moya *et al.*, 2010). De igual forma, combinaciones de fermentos de raquis de plantas de *Musa* y de fungicidas químicos, pueden tener un control efectivo contra sigatoka negra (Martínez *et al.*, 2013).

Otros de los compuestos detectados en el fermentado de raquis de plátano, que pudo afectar el crecimiento del hongo, son los alcaloides hallados en cantidades trazas. Además que, no se encontraron fenoles ni aceites esenciales.

Durante la fermentación de los raquis, muchos microorganismos segregan metabolitos secundarios capaces de actuar como biocidas en otros microorganismos. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, tienen la capacidad de producir metabolitos (enzimas quinolíticas y glucanolíticas) que alteraron la estructura de la pared celular del micelio y las ascosporas de hongos que inhibieron en condiciones *in vitro*, el desarrollo de microorganismos patógenos (Ceballos *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en el análisis bromatológico de los fermentos (Cuadro 4), muestran la presencia de elementos minerales que van desde los macros y microelementos (N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, Na y B). El elemento K se encontró en cantidades de 1,28%, un tercio más bajo que para la norma desarrollada del plátano (4,49%) en tejido foliar, lo cual aporta a las plantas una buena cantidad de un elemento de gran importancia para el cultivo, ya que puede llegar a extraer del suelo hasta 400 kg ha año⁻¹ (Rodríguez y Rodríguez, 1997). Lo anterior se ha observado en fermentos de raquis de banano, en concentraciones de 7.000 ppm, lo cual indica que estos son una fuente nutricional de K aplicable por vía foliar. De la misma forma, el B se mostró en cantidades moderadas (Martínez *et al.*, 2013).

No se detectó Cu en los resultados del análisis bromatológico, lo cual indica que los fermentos carecen de este elemento. En estudios realizados en fermentos de raquis de banano, a pesar de haberse detectado la presencia del elemento Cu, este se presentó en cantidades muy bajas con respecto a los demás elementos minerales (Martínez *et al.*, 2013).

Cuadro 4. Composición mineral de los fermentos a base de raquis de plátano con extractos de 2 (E2) y 4 (E4) meses de fermentación.

Fermentos	Elementos minerales											pH
	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Na %	Zn ppm	Fe ppm	Mn ppm	B ppm	CE ds/m	
E2	0,02	0,02	1,28	0,08	0,09	0,0001	0,2	0,62	0,02	17	>12	8,99
E4	0,01	0,02	1,38	0,07	0,06	0,0001	0,24	0,67	0,02	20	>12	9,21

Todos los nutrientes presentes en el fermento aplicado por vía foliar, podrían brindar a las plantas una buena fuente de elementos necesarios para su nutrición, contribuyendo al crecimiento y desarrollo de la planta y quizás a desarrollar resistencia al ataque de sigatoka y otras enfermedades que pudieran afectar las hojas de este cultivo. También, ahorrar en fertilizantes foliares, cuando se realizan las aplicaciones aéreas de fungicidas químicos para el control de sigatoka negra.

A pesar de que el crecimiento del hongo en condiciones *in vitro* E4 respecto al E2 fueron distintos, en los análisis bromatológicos para ambos fermentos se observaron similitudes referente a los valores en la composición mineral y conductividad eléctrica (Cuadro 4). Solo se observó un pH más alto de 9,21 en E4 que en el E2 con 8,99. Este valor más básico podría estar limitando el crecimiento y desarrollo del hongo en el medio de cultivo y quizás en las hojas al aplicarlo en condiciones de campo.

En general, los fermentos a base de plátano podrían representar una alternativa económica y ecológica para el control de la sigatoka negra en campo, pudiéndose elaborar fácilmente de forma artesanal con los raquis de plátano de la misma unidad de producción. Además, la aplicación de estos fermentos podrían ofrecer una alternativa para disminuir las aplicaciones foliares, tanto en frecuencia como en cantidad de productos químicos que contaminan las zonas productoras de este rubro de gran importancia para nuestro país.

CONCLUSIÓN

El hongo causante de la sigatoka negra *M. fijiensis* Morelet en condiciones *in vitro*, ha perdido sensibilidad a fungicidas químicos, tales como los benzimidazoles y propiconazoles. Mientras que con la utilización de fermentos a base de raquis de plátano, se observó una mayor inhibición de la germinación y crecimiento del hongo, lo que podría convertirse en una alternativa económica y ecológica para el control de esta enfermedad, si se manejara de forma integrada en las plantaciones del cultivo del plátano en el país.

LITERATURA CITADA

- Álvarez E., J. Cortes y G. Ceballos. 2010. "Alternativas para el manejo de la sigatoka negra en plátano Dominico Hartón (AAB) mediante el uso de lixiviados y productos biológicos". In: Boletín Musalac. 1(2):3-5.
- Beveraggi A., M. F. Zapater y X. Mourichon. 1995. Análisis de la resistencia de los bananos a la sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*). CIRAD-CA. Montpellier (FRA). Extraído de Referencias bibliográficas Musa Doc- 1999, sobre bananos y plátanos de las Memorias XIII Reunión ACORBAT, Guayaquil, Ecuador. pp. 6-11.
- Borges O. L. 1971. Tamaño y densidad de estomas en clones cultivados y especies silvestres de *Musa*. *Agronomía Trop.* 21(2):139-143.

- Ceballos I., S. Mosquera, M. Angulo, J. Mira, L. Argel, D. Uribe, M. Romero, S. Orduz and V. Villegas. 2012. Cultivable bacteria population associated with leave of banana and plantain and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Environmental Microbiology. May. DOI 10.1007/s00248-0212-0052-8.
- Guzmán M., M. Orozco-Santos y L. Pérez Vicente. 2013. Las enfermedades sigatoka de las hojas del banano: Dispersión, impacto y evolución de las estrategias de manejo en América Latina y el Caribe. In: XX Reunión ACORBAT 2013; Fortaleza, Brasil. Memoria BR. pp. 98-116.
- Linconl T. and E. Zeiger. 2006. Secondary metabolites and plant defense. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinzuer Asociado. Cap 13.
- Madrigal A. y W. Ruess. 1998. CGA245704 un nuevo activador de plantas para aumentar la resistencia natural del cultivo del banano contra sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Extraído de Referencias bibliográficas sobre bananos y plátanos de las Memorias XIII Reunión ACORBAT, Guayaquil, Ecuador. pp. 266-274.
- Mateus J., M. Mayorga y B. Ramírez. 1987. Guía para el laboratorio para el manejo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) ICA. Colombia. 27 p.
- Martínez G., R. Pargas y D. Muños. 1997. "La sigatoka negra y su avance en el territorio venezolano: implicaciones socioeconómicas". Disponible en: <http://www.fonaiap.gov.ve/publica/divulga/fd59/sigatok.html> [Nov. 29, 2013]
- Martínez L., D. Teliz, S. Balalcazar, J. Cortés, D. Nieto, L. Mora, J. Rodríguez y B. Canche. 2013. Efecto de lixiviados del raquis en el crecimiento, nutrición y sanidad del cultivo del banano. In: XX Reunión ACORBAT 2013 Fortaleza, Brasil. Memoria. 160 p.
- Moya E., R. Gamboa y G. Apablaza. 2010. Evaluación de un fermentos de saponina de *Quillaja saponaria* para el control de *Oidios* de trigo y zapallo. Rev. Agro Sur. Valdivia. 38(2):87-96.
- Nava C. 1997. El plátano, su cultivo en Venezuela. Ediciones Astro Data. Maracaibo. 122 p.
- Orosco S., K. García Mariscal, G. Manzo-Sánchez, S. Guzmán, L. Martínez, M. Beltrán, E. Garrido, J. Torres y B. Canto. 2013. La sigatoka negra y su manejo integrado en banano. Libro técnico N° 1. SARGAPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima México. 153 p.
- Pineda J., A. Carrasco, R. Cardona y R. Cooz. 1997. Presencia de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en las principales zonas plataneras de Venezuela. Bioagro. 9(2):52-60.
- Ruiz J., D. Egred, P. Bryant y T. Dougherty. 2013. Evaluación *in vitro* del efecto del Biofungicida Ausoil 23 Ec™ en mezcla con fungicida del grupo de los triazoles sobre poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* con pérdida de sensibilidad ante fungicidas comerciales. Memorias del XX ACORBAT 2013. Fortaleza, Brasil. 275 p.
- Rodríguez V. y O. Rodríguez. 1997. Normas foliares DRIS para el diagnóstico nutricional del plátano (*Musa* AAB subgrupo plátano cv. Hartón). Rev.Fac. Agron (LUZ) 14:285-296.
- Sepúlveda L. y R. Arango. 2013. Comportamiento fenotípico *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* y su relación con la sensibilidad a fungicidas. Memorias del XX ACORBAT 2013. Fortaleza, Brasil. 295 p.