

## Evaluación de formulaciones de *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra causado por *Mycosphaerella fijiensis*.

Jaime A. Gutierrez<sup>1</sup>, Valeska Villegas<sup>1</sup>, Jhon J. Mira<sup>2</sup>, Luz Edith Argel<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Grupo GIPAB, Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

[vvilleg2@eafit.edu.co](mailto:vvilleg2@eafit.edu.co)

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones del Banano “Cenibanano”, Carepa (Antioquia), Colombia.

[jmira@augura.com](mailto:jmira@augura.com)

---

### Resumen

La Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es la enfermedad más devastadora del cultivo de banano y plátano alrededor del mundo. Hasta el momento el control químico ha demostrado ser la técnica más eficaz, sin embargo esto ha generado problemas ambientales y económicos que han llevado al desarrollo de otras técnicas como el empleo de formulaciones biológicas. En este trabajo se evaluó el desempeño de dos formulaciones de *Bacillus subtilis* EA-CB0015, una mezcla base agua, una emulsión y la suspensión bacteriana. En relación al control de la enfermedad, el bioformulado que presentó los mejores resultados fue la mezcla base agua: a nivel *in-vitro* la formulación mezcla base agua inhibió el tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* un 66,1% sin presentar diferencias significativas con los controles químico y biológico; a nivel de invernadero la mezcla agua fue la única formulación que presentó control sobre la enfermedad con un porcentaje de área necrosada de 2,29%, sin presentar diferencias significativas con el 1,0 % mostrado por el control químico Dithane®.

Se evaluó la viabilidad de los bioformulados al ser sometidos a diversas condiciones ambientales: En relación a la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 tras almacenar las formulaciones por 6 meses a 4°C y 25°C se encontró que a 25°C todas perdían entre un 47 a un 49% de la viabilidad sin presentar diferencias significativas entre ellas; mientras que a 4°C prácticamente no se presentó pérdida significativa de la viabilidad.

Para la tolerancia de las bioformulaciones a la radiación U.V., la emulsión fue el que más protegió a las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 con un  $t_{d50}$  de 37,39 minutos, esto comparado a la mezcla base agua con un  $t_{d50}$  de 7,77 minutos y a la suspensión bacteriana con un  $t_{d50}$  de 6,67 minutos. Ninguna de las formulaciones evaluadas igualó al control biológico Rhapsody®, el cual mostró un  $t_{d50}$  mayor que 180 minutos y una reducción total de 24,1% en 180 min.

Con relación a la tolerancia a las mezclas de fungicidas se encontró que los bioformulados eran altamente tolerantes, la formulación mezcla base agua mostró un  $t_{d50}$  mayor a 25 horas para todas las mezclas evaluadas y la suspensión bacteriana un  $t_{d50} > 25$  horas para 5 de las 8 mezclas evaluadas.

Por último se evaluó el lavado con lluvia, allí la emulsión presentó el mejor comportamiento con un porcentaje de adherencia a la superficie de 17,0% sin diferencias significativas con el control positivo Rhapsody® (20,4%); la suspensión bacteriana y la mezcla agua presentaron % de adherencia de 5,3% y 4,5% respectivamente. Esto comparado a los controles químicos Bravonil® y Dithane® que presentaron porcentajes de adherencia de 83,7% y 80,4%.

**Palabras claves:** Formulaciones biológicas, *Mycosphaerella fijiensis*, *Musa* spp., Control biológico, *Bacillus subtilis*.

## 1. Introducción

El banano es uno de los productos de exportación agrícola más importantes a nivel mundial. Es cultivado en los cinco continentes y se convierte en alimento básico para millones de personas en el planeta (Frison y Sharrock 1999). En términos de volumen, representa una de las primeras frutas de exportación y en términos económicos ocupa el segundo lugar después de los cítricos según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2008). Anualmente en el mundo se comercializan cerca de 15 millones de toneladas de banano, equivalentes a US \$12.972'756.000, Colombia participa con el 12,32% de las exportaciones con cerca de 1,8 millones de toneladas, equivalentes a US \$1.660'924.230 (FAO, 2008).

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad más devastadora de los cultivos de banano y plátano en el mundo. Dicha enfermedad causa un deterioro significativo en el área foliar, una disminución en la productividad y en la calidad de la fruta cuando no se le combate (Marín y Romero, 1992; Arias *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2003). En Colombia, se han reportado reducciones de hasta un 60% en el peso del racimo en plantaciones donde no se le controla (Belalcázar, 1991).

El control químico es el método más utilizado para el combate de la Sigatoka negra lo que ha llevado a un deterioro paulatino de la fauna, flora, suelos y fuentes acuíferas en las regiones de cultivo (Astorga, 1999; Vindas *et al.*, 2004). Por otro lado, el uso continuo e irracional de fungicidas ha originado cepas de *M. fijiensis* resistentes a los ingredientes activos de algunos productos, trayendo como consecuencia una disminución en los agentes disponibles para su control y un aumento en el número de ciclos de aspersión y en el costo de producción de la fruta (Marín *et al.*, 2003). En la zona del Urabá antioqueño se ha estimado para el 2010 un costo de fungicidas de US \$18'700.000 para el control de la Sigatoka negra, esto sin tener en cuenta los costos de la aerofumigación (Gutiérrez, 2010). Todo esto más la exigencia de medidas de control ambientalmente seguras, hacen evidente la necesidad de investigar e implementar estrategias de manejo sostenible como el control biológico.

Actualmente se han reportado microorganismos que ejercen un control sobre el crecimiento de *M. fijiensis* y el desarrollo de la Sigatoka negra a escala de laboratorio, en invernadero y campo (Gonzales, 1995; Miranda, 1996; Talavera, 1996; Salazar, 2005; Osorio, 2006; Ceballos, 2009), sin embargo en Colombia no se encuentra registrado ningún fungicida biológico producido en el país para el control de la Sigatoka negra (Navarro *et al.*, 2004)

Ceballos (2009) hizo un estudio de la población bacteriana presente en la filósfera de diferentes cultivares de *Musa* spp. en el Urabá Antioqueño. En este estudio se aislaron 648 BAFE's (Bacterias aerobias formadoras de esporas) y se evaluó la capacidad antagonista de sus metabolitos contra *M. fijiensis in vitro*. A partir de este estudio se seleccionó la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 como agente de control biológico por ser capaz de inhibir el crecimiento del hongo en un 92% *in vitro*. En un estudio posterior, Proyecto Colciencias – EAFIT – Augura, código 12164030656 se desarrollaron dos formulaciones, una base agua y una emulsión de *B. subtilis* EA-CB0015 que son objeto de estudio en este trabajo.

En este trabajo se evaluó la capacidad de *B. subtilis* EA-CB0015 de permanecer viable luego de someter las formulaciones a un periodo de almacenamiento, la efectividad de las bioformulaciones en el control del hongo y la enfermedad a nivel *in vitro* y en invernadero. También se determinó si las formulaciones eran capaces de proteger el agente de control biológico ante las condiciones medioambientales adversas a las que serían sometidos al aplicarse en la planta. Por último, se evaluó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 tras la exposición a la radiación U.V. y la presencia de fungicidas químicos, además de la adherencia del bioformulado tras ser sometido al lavado por lluvia.

## 2. Materiales y métodos.

### • Microorganismo de estudio

Se empleó como ingrediente activo de las formulaciones la cepa de *B. subtilis* EA-CB0015 aislada de la filósfera por Ceballos en el 2009 de hojas de banano en el Urabá Antioqueño. Esta cepa fue almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  en caldo TSB y glicerol al 20% y fueron activadas en medio TSA al 50%. Las cepas de *M. fijiensis* se aislaron de hojas de banano c.v. Gran Enano provenientes de la zona de Urabá - Antioquia en estadio seis de la enfermedad según la escala de Fouré (1982) y siguiendo la metodología empleada por Cenibanano (Dupont, 1982).

### • Formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015

La producción de los diferentes formulados de las cepas *B. subtilis* EA0015 se realizó mediante la producción de biomasa en cultivo sumergido y posteriormente mezclando el cultivo bacteriano con los componentes descritos en la tabla 1. El cultivo bacteriano se obtuvo transfiriendo 20 mL de un cultivo nocturno obtenido en medio Finley (g/L: 3 extracto de levadura, 1.9 peptona, y  $0.0043 \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 180 mL de medio Finley contenido en un erlenmeyer de 1 L e incubado por 72 h, 150 rpm y  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente a los cultivos bacterianos obtenidos se les adicionó 0,5% V/V de ácido propiónico y 3% V/V de buffer fosfato 3 M pH 5 y se agitaron vigorosamente para luego ser utilizados en el procesamiento de la formulación mezcla base agua (MH2O) y la emulsión aceite en agua (EMU).

La formulación acuosa se preparó adicionando al cultivo bacteriano acidificado carboximetilcelulosa (3,5 % p/V), ácido propiónico (0,5 % V/V), glicerol (2 % V/V) y goma Xanthan (0,1 % P/V). La mezcla fue agitada y almacenada a temperatura ambiente hasta su posterior uso. La formulación emulsión aceite en agua (EMU) se preparó adicionando al cultivo bacteriano acidificado aceite de girasol (16,7 % V/V), goma Xanthan (0,6 % P/V), ácido propiónico (0,5 % V/V), buffer fosfato pH 5 3 M (3 % V/V) y tween 80 (2,3 % V/V). La mezcla fue agitada y almacenada a temperatura ambiente hasta su posterior uso. La suspensión bacteriana (SB) consistió únicamente del cultivo bacteriano obtenido después de las 72 h de fermentación. En todos los casos la concentración bacteriana de todos los formulados estuvo en  $1 \times 10^8 \pm 0,1 \text{ UFC/mL}$ .

Los controles de los formulados sin suspensión bacteriana fueron utilizados para los experimentos de antagonismo *in vitro* contra *M. fijiensis*.

Tabla 1. Composición de los diferentes formulados de *B. subtilis*

| Tipo                  | Siglas | Composición   |
|-----------------------|--------|---|
| Suspensión bacteriana | BS     | Cultivo bacteriano (100%)   |
| Mezcla base agua      | MH2O   | Cultivo bacteriano (93,9%), carboximetil celulosa de sodio CMC (3,5% w/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (3% v/v), glicerol (2 v/v), tween 20 (0.5% v/v), triton X-100 (0.5%), ácido propiónico (0,5 v/v) y goma xanthan (0,1 w/v). |
| Emulsión              | EMU    | Cultivo bacteriano (76,7% v/v), aceite de girasol (16,7% v/v), buffer fosfato 3 M pH 5 (3% v/v), tween 80 (2.3% v/v), goma xanthan (0,6 w/v), ácido y propiónico (0,5 v/v)  |

### • Actividad antagónica de los formulados en base a *B. subtilis* EA-CB0015

Para la evaluación del antagonismo de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 a través del tiempo se empleó la técnica de inhibición de ascosporas descrita por Talavera y colaboradores

(1996) y empleada por Ceballos (2009). Se determinó el efecto de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 sobre el desarrollo del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* en una hoja de banano sana. Para esto se recortaron discos de 9 cm de diámetro de una hoja número 1 sana de la variedad Gran Enano, se desinfectaron sumergiéndolas por un minuto en etanol al 70% y se hicieron tres lavados con agua estéril cada uno de un minuto, luego estos discos fueron sumergidos en muestras de cada formulado que se encontraban almacenados por tres meses a 25°C o a 4°C y se dejaron secar.

Las descargas de las ascosporas se realizaron siguiendo la metodología de Dupont (1982): para ello, se tomaron piezas de tejido infectado obtenido de plantas enfermas en estadio seis de la escala de Fouré (1982) de la zona del Urabá antioqueño sin influencia de fumigación aérea y se graparon a discos de papel kraft con el envés de la hoja hacia el exterior. Estos discos se humedecieron y guardaron en bolsas selladas durante 48 horas. Luego se realizaron las descargas de ascosporas por una hora sobre el envés de los discos de las hojas con los tratamientos y se incubaron en cajas Petri con un pedazo de papel humedecido a 21°C por 48 horas. Pasado el periodo de incubación, el envés de las hojas se pintó con barniz transparente y se dejó secar por 24 horas. El barniz fue retirado de la hoja y teñido con safranina para observar con la ayuda de un microscopio las ascosporas adheridas a este.

Para determinar la germinación de las ascosporas se promedió la longitud ( $L$ ) de los tubos germinativos de 30 ascosporas por disco. La medición se realizó con el programa de procesamiento de imágenes Axio Vision® 4.2 de Zeiss® analizándose dos discos por tratamiento.

La variable de respuesta evaluada fue el porcentaje de inhibición en la germinación de las ascosporas y se calculó considerando la germinación de las esporas del control absoluto ( $C_{Abs}$ ) como 100% y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inh} = \frac{L.Cabs - L.trat}{L.Cabs} * 100 \text{ (ecuación 1)}$$

Donde:

$L.Cabs$ : Longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* para cada tratamiento evaluado.

$L.trat$ : Longitud del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* del control absoluto.

$\% \text{ de inh}$ : % de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*.

- **Evaluación de la viabilidad de los formulados en base a *B. subtilis* EA-CB0015**

Para evaluar la vida útil de la suspensión bacteriana (SB), la mezcla base agua (MH<sub>2</sub>O) y la emulsión almacenadas a 25°C y 4°C se determinó las UFC/mL a partir de la técnica de diluciones seriadas y sembrado por superficie en medio TSA al 50% durante un periodo de 6 meses. Cada formulación se almacenó en recipientes de polietileno de baja densidad a las temperaturas antes descritas: Un mL de cada formulación se añade a 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo, y luego se diluyen en serie hasta  $10^{-5}$ . Las cajas de TSA fueron inoculados con 100 uL de cada dilución y se incubaron durante 48 horas a 30 °C por un día, posteriormente se hizo el conteo de UFC. Se realizaron dos réplicas por tratamiento.

- **Resistencia de *B. subtilis* EA-CB0015 a la radiación U.V.**

Para evaluar la tolerancia de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 a la radiación U.V., se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter las formulaciones a radiación U.V., esto se realizó empleando la metodología planteada por Boyd–Wilson (2002).

De cada formulación se tomó una muestra de 20 mL que fue sometida a una fuente de radiación Phillips U.V.-C (254 nm) de 30 Watts de potencia durante 180 minutos. La muestra se depositó en un recipiente de vidrio con agitación magnética a 22 cm de la fuente de radiación y se evaluó la viabilidad en diferentes tiempos empleando las técnicas de diluciones seriadas y sembrado por superficie descrita en el numeral anterior.

- **Evaluación de la tolerancia de los formulados a las mezclas con fungicidas químicos.**

Para determinar si las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 pueden actuar en combinación con las mezclas de fungicidas químicos se determinó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 antes y después de someter las formulaciones a las mezclas de tanque empleadas para el control de la Sigatoka negra en plantaciones comerciales. Para esto se tomaron muestras de 10 mL de cada formulación las cuales fueron sometidas a las diferentes mezclas de tanque descritas en la tabla 3. Las mezclas de fungicidas químicos se realizaron de acuerdo a lo descrito por Becerra (2007). Para cada una de las mezclas se evaluó la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 utilizando la técnica de diluciones seriadas y sembrado por superficie descrita anteriormente (numeral 5.4.) en diferentes tiempos.

- **Resistencia de los formulados al lavado por la lluvia.**

Para evaluar la susceptibilidad de los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 al lavado por la lluvia se empleó la metodología descrita por Brar y colaboradores (2007), se tomaron muestras de 1 mL de cada formulado y se esparcieron uniformemente en una superficie plana de vidrio pyrex previamente secada y pesada. La formulación se dejó secar a 30°C por 2 horas, que corresponde al tiempo mínimo necesario recomendado por las casas productoras de agroquímicos para garantizar adherencia de la mezcla en la hoja antes de que comience a llover (Gutiérrez, 2010)

Cada placa se colocó a 2 cm por debajo de una bureta de 100 mL con 40 mL de agua destilada que se dejó caer sobre la superficie a una velocidad de 20 mL/min. Durante el proceso la placa se movió continuamente de abajo a arriba y de un lado a otro para lograr un lavado uniforme.

Terminado este proceso, se dejaron secar las placas a 30°C hasta peso constante y se pesaron.

Para esta evaluación se empleó un diseño unifactorial en donde el factor evaluado fue tipo de formulado con tres niveles (emulsión, mezcla base agua y caldo de cultivo), como variable de respuesta se determinó el porcentaje de adherencia a la superficie de vidrio empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de adh} = \left( 1 - \frac{W_{formu} - W_{final}}{W_{formu} - W_{pyrex}} \right) * 100 \text{ (ecuación 3)}$$

Para:

*W<sub>formu</sub>*: Peso seco de la superficie de vidrio más la formulación luego de transcurrido 2 horas.

*W<sub>pyrex</sub>*: Peso seco de la superficie de vidrio

*W<sub>final</sub>*: Peso de la superficie de vidrio más la formulación luego del lavado con 40 mL de agua luego de alcanzado peso constante.

*% de adh*: Porcentaje de adherencia del formulado a la superficie luego del proceso de lavado.

Como control positivo se evaluaron los fungicidas Dithane F-MB®, Bravonil® y como control biológico el fungicida Rhapsody®. Para cada ensayo se realizaron 3 réplicas por tratamiento.

- **Evaluación del efecto de las bioformulaciones sobre la Sigatoka negra en invernadero.**

Los experimentos a nivel de invernadero se llevaron a cabo para seleccionar las mejores formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 que controlan la enfermedad de la Sigatoka negra. Este experimento se realizó en Medellín (Colombia) con condiciones de humedad entre 90 y 95% a temperatura entre 28 y 31 °C.

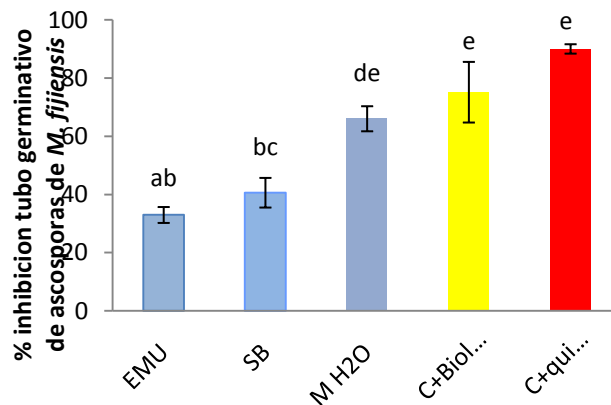
En el primero experimento, las plantas de banano cv. Williams fueron cultivadas en bolsas plásticas hasta que alcanzaron 4 meses de edad. Cada planta fue posteriormente inoculada con una suspensión micelial de *M. fijiensis* de 10 días de edad y al cabo de 12 días de incubación se aplicaron las formulaciones de *B. subtilis* EA0015. Las formulaciones fueron diluidas hasta una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL y se asperaron 30 gotas/cm<sup>2</sup> con un aerógrafo (Mini Spray gun with cup K-3®) a una altura de 30 cm de las hojas. El grado de severidad de la enfermedad fue determinado al cabo de 1 mes de la aplicación de los formulados con la escala de **Fouré** (1982). Para ello se tomaron fotos de las hojas y se determinó el área necrosada con el software Axio Visio® 4,2 de Zeiss®.

En este experimento se utilizó un diseño unifactorial completamente aleatorio con tres replicas por tratamiento y 6 plantas por réplica. Se utilizaron como control negativo aplicación de agua estéril y como control positivo Dithane® según las recomendaciones del comerciante.

### 3. Resultados

- **Evaluación de la actividad antagonista de los formulados**

En la gráfica 1 se observa que la formulación mezcla base agua (M H<sub>2</sub>O) fue la formulación que mostró una mayor capacidad de inhibir al patógeno, con un porcentaje de inhibición del tubo germinativo de  $66,1 \pm 4,3\%$ , ésta no presentó diferencias significativas con los controles positivo químico y biológico (C+químico, C+biológico) con porcentajes de inhibición de  $90,1 \pm 1,61\%$  y  $75,2 \pm 10,43\%$  respectivamente. La emulsión y la suspensión bacteriana fueron los tratamientos que mostraron la menor capacidad de inhibir el patógeno, con porcentajes de inhibición de  $33,0 \pm 2,7\%$  y  $40,6 \pm 5,1\%$ , respectivamente; valores significativamente inferiores a los presentados por los controles positivos pero sin diferencias estadísticas entre ellos.

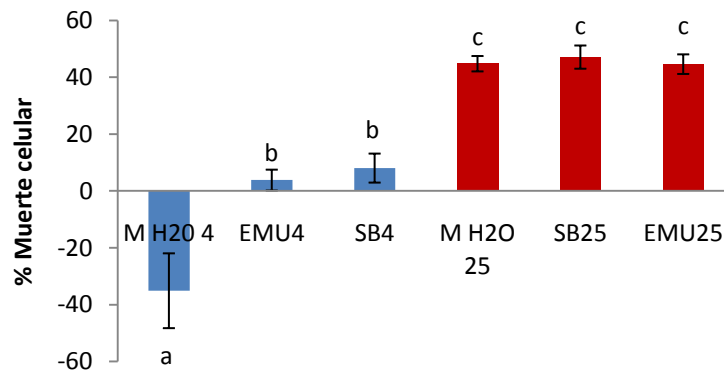


**Gráfica 1.** Porcentaje de inhibición del tubo germinativo de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 luego de tres meses de almacenamiento.

- **Evaluación de la viabilidad de los formulados en base a *B. subtilis* EA-CB0015**

Como se aprecia en la gráfica 2, para todas las formulaciones la temperatura de almacenamiento de 25°C generó una mayor disminución en la viabilidad de *B. subtilis* EA-CB0015 con porcentajes entre 44,7 % y 47,1 %, sin diferencias significativas para los diferentes formulados,

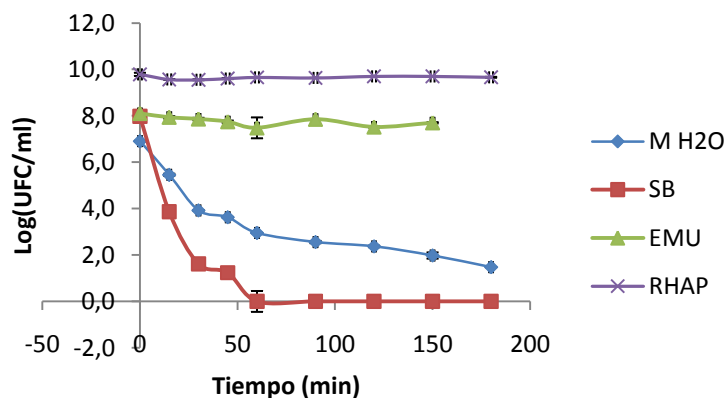
ésto comparado con la temperatura de 4°C en donde se obtuvieron disminuciones entre -35,0 % y 8,1 %. En esta temperatura, la mezcla base agua (M4) presentó un crecimiento en las UFC/mL del 35,0 % luego de los 180 días de almacenamiento mientras que la suspensión bacteriana y la emulsión presentaron reducciones inferiores al 10,0 % sin diferencias entre ellas. Estos resultados sugieren que al inicio del almacenamiento hay un aumento celular debido posiblemente a una germinación de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 y posteriormente una división celular por consumo de algunos nutrientes presentes en la formulación y que la mayor muerte celular a temperatura de 25°C podría sugerir que a estas condiciones de temperatura las células se dividen pero igualmente ocurre lisis celular con el paso del tiempo.



**Gráfico 2:** Porcentaje de muerte de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 después de 180 días de almacenamiento a dos temperaturas (4°C y 25°C).

- **Resistencia de *B. subtilis* EA-CB0015 a la radiación U.V.**

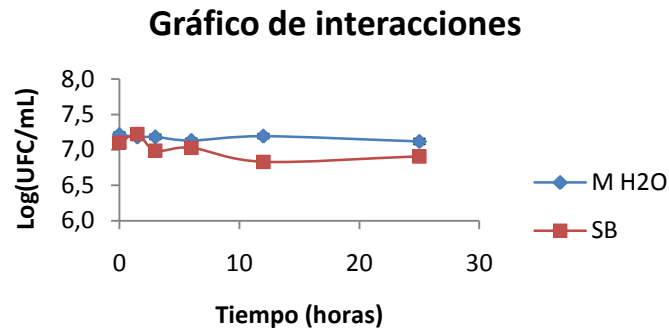
En la gráfica 3 se observa que las formulaciones en base agua (M H2O) y suspensión bacteriana (SB) muestran un descenso significativo en el número de UFC/mL, la suspensión bacteriana pierde el 100% de su viabilidad a los 60 minutos, mientras que la formulación en base agua pierde el 99 % a los 180 minutos, esto a diferencia del control biológico Rhapsody® el cual mantiene su viabilidad constante durante todo el tiempo de evaluación.



**Gráfico 3.** Cinética de viabilidad de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 expuestas a la radiación U.V. (254 nm).

- **Evaluación de la tolerancia de los formulados a las mezclas con fungicidas químicos.**

En la siguiente gráfica se muestra la interacción entre los factores tiempo y tipo de formulación, independiente del factor mezcla de fungicidas.

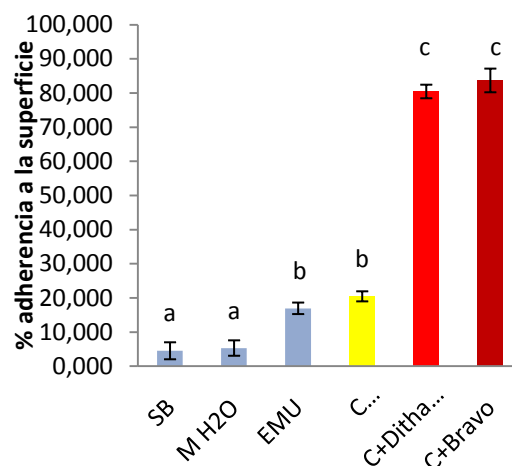


**Gráfica 4.** Cinética de viabilidad de las formulaciones expuestas a mezclas con fungicidas químicos.

En la gráfica 4 se muestra que la formulación mezcla base agua (M H<sub>2</sub>O) presentó una menor muerte celular en el tiempo que la suspensión bacteriana (SB), esto independiente de las mezclas de fungicidas evaluadas. La suspensión bacteriana comenzó a presentar una pérdida en la viabilidad a partir de la tercera hora hasta alcanzar una pérdida máxima de 36,3 % a la hora 25, comparado a la mezcla de base agua que en la hora 25 presentó una reducción en la viabilidad del 20,1 %.

Además, la formulación mezcla base agua para todas las mezclas fungicidas presentó un  $t_{d50}$  mayor a veinticinco horas y la suspensión bacteriana presentó un  $t_{d50}$  mayor a 25 horas en cinco de las ocho mezclas de fungicidas.

- **Resistencia de los formulados al lavado por la lluvia.**

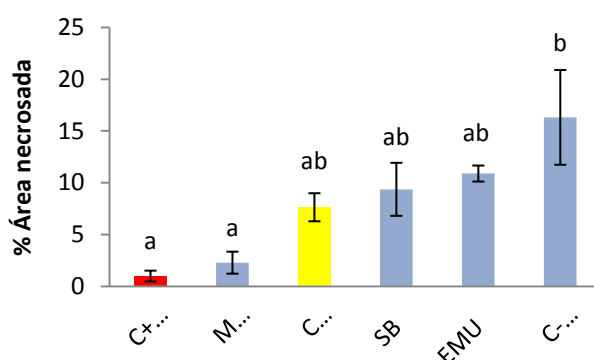


**Gráfica 5.** Porcentaje de adherencia a la superficie de las formulaciones del *B. subtilis* EA-CB0015 luego de ser sometidos al lavado simulado por lluvia.



En la gráfica 5 se aprecia que la emulsión fue la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que presentó mayor adherencia con un porcentaje de adherencia de 16,9%. La suspensión bacteriana y la mezcla agua mostraron menor capacidad con porcentajes de adherencia estadísticamente similares de 4,5% y 5,3%, respectivamente. Todos los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 presentaron una adherencia inferior a la presentada por los controles químicos Dithane® y Bravonil® con porcentajes de adherencia de 80,4% y 83,7% respectivamente. Con relación al control biológico Rhapsody®, el cuál presentó un porcentaje de adherencia de 20,4%, sólo la emulsión mostró una capacidad de adherencia similar. Estos resultados sugieren que las formulaciones en base a *B. subtilis* EA-CB0015 poseen mayor afinidad por el agua que por la superficie de la placa de vidrio utilizado en este experimento, lo que conlleva a replantear la composición de los formulados en orden a mejorar su resistencia al lavado por la lluvia.

- **Evaluación del efecto de las bioformulaciones sobre la Sigatoka negra en invernadero.**



**Gráfica 6.** Porcentaje de área necrosada de la hoja número uno de plantas de banano cv. Williams infectadas con *M. fijiensis* y tratadas con las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015.

Como se observa en la gráfica 7, la formulación base agua con un porcentaje de área necrosada de  $2,3 \pm 1,1\%$  y el control positivo Dithane® con  $1 \pm 0,53\%$  de área necrosada fueron los únicos tratamientos que mostraron algún tipo de control sobre la enfermedad, mostrando diferencias estadísticas con el  $16,3 \pm 4,6\%$  de área necrosada de las plantas no tratadas. La suspensión bacteriana con un porcentaje de área necrosada de  $9,4 \pm 2,6\%$ , la emulsión con  $10,9 \pm 0,8\%$  y el control biológico Rhapsody® con  $7,6 \pm 1,4\%$  no presentaron diferencias significativas con las plantas no tratadas.

#### 4. DISCUSIÓN

Se encontró que la formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 fue capaz de inhibir el crecimiento del patógeno en un 66,1%. Ésta presentó un control similar al alcanzado con dos productos, uno químico y uno biológico (Dithane® y Rapsody®) registrados para el control de la Sigatoka negra en banano. Esto es compatible con los resultados reportados por otros autores: Ceballos, 2009 encontró que el sobrenadante libre de células de la cepa *B. subtilis* EA-CB0015 sin formular presentó un porcentaje de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* a nivel *in vitro* de 84 % en una prueba de inhibición del tubo germinativo similar a la descrita en el numeral 5.3., ese porcentaje de inhibición que fue superior al hallado en este trabajo, puede deberse a que al adicionar los aditivos para la formulación los productos de la fermentación de *B. subtilis* EA-CB0015 fueron diluidos.

Otra de las características que debe cumplir un formulado biológico para que se considere aceptable es conservar la viabilidad del agente biológico. Brar y colaboradores (2006) utilizaron el ácido propionico como un agente antimicrobiano para una formulación en base a *Bacillus*

*thurigiensis*. De este estudio se seleccionó este adyuvante para las formulaciones en base a *B. subtilis* EA-CB0015 como un agente que evitaría la contaminación con otros microorganismos, sin embargo no se evaluó si el ácido propiónico también tiene un efecto tóxico contra las esporas y por tanto no se observó si es el responsable de la muerte de la cepa. Andrews (1992) afirmó que es permisible una reducción máxima de la viabilidad de la cepa del 30% en un periodo de 6 meses, de hecho el control biológico utilizado para esta investigación y comercializado en Colombia bajo los nombres de Serenade® registro ICA No. 5973 y Rhapsody® registro ICA No. 5770 garantizan un control efectivo y viabilidad de la cepa durante dos años luego de la fabricación del producto (Información sobre el producto, <http://www.agrocorp.com.co/file/ftecnica/ftRHAPSODY.pdf>, consultada Junio 20 de 2011). Los datos sobre viabilidad encontrados en este trabajo evidencian que para que las formulaciones cumplan con los requerimientos mínimos de viabilidad para su comercialización deben ser refrigeradas y para lograr que puedan conservar la viabilidad al ser almacenadas a temperatura ambiente es necesario modificar su composición o agregar algún tipo de coadyuvante.

La emulsión fue la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que presentó el mejor desempeño en la prueba de resistencia a la radiación U.V., este comportamiento puede deberse al color blanco del formulado capaz de reflejar la radiación (Boyd-Wilson, *et al.*, 1998; Sudin & Jacobs 1999; Jacobs, Carroll & Sudin 2005), sin embargo, se recomienda la adición de un protector U.V. como lignina en emulsión, lignosulfonato de sodio, rojo congo, ácido fólico y ácido *p*-aminobenzoico que proteja a las bacterias del potencial daño causado por la radiación (Brar *et al.*, 2006; Sheyler *et al.*, 2009). En estudios similares Scheiler y colaboradores (2009) evaluaron la viabilidad de una cepa de *Bacillus spp.* en emulsión al ser expuesta este tipo de radiación: La formulación que no contenía lignina como protector U.V. presentó una reducción de la viabilidad celular del 51% después de 31 horas de exposición a la radiación U.V.-A y U.V.-B solares. La formulación que contenía lignina, en esas mismas condiciones, presentó una reducción de la viabilidad del 16%.

Por otro lado se encontró que la formulación en base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 permaneció 25 horas en contacto con las mezclas de tanque actualmente empleadas en los cultivos comerciales de banano sin perder la viabilidad del 50 % de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015, alcanzando reducciones promedio de solo el 20,1 % en la viabilidad; inclusive para el caso de la suspensión bacteriana se encontró que en cinco de las ocho mezclas fungicidas evaluadas la cepa no perdió más del 50% de la viabilidad a las 25 horas. Estos resultados sugieren que estas formulaciones tienen una alta tolerancia a las mezclas de fungicidas químicos empleados para el control de la Sigatoka negra. Esto representa una ventaja de la formulación desarrollada ya que puede emplearse en programas de manejo integrado en donde se implemente el control biológico en combinación con el producto químico.

El lavado por lluvia es otro factor ambiental al que están sometidos los formulados al ser aplicados en la planta, los resultados obtenidos en este estudio con relación a esta presión ambiental muestran una pobre adhesión de los formulados a la superficie evaluada. La formulación en emulsión fue la que presentó el mejor comportamiento con un porcentaje de adherencia de 16,9%, resultado muy inferior a lo reportado en la literatura. Jaronski (2010) realizó un estudio en donde evaluó algunos factores ambientales de formulaciones en suspensión acuosa basadas en hongos ascomycetes, entre ellos el lavado por lluvia y obtuvo porcentajes de adherencia entre 51- 56% cuando se expusieron a una llovizna controlada en el laboratorio durante 30 minutos correspondiente a 27 mm de lluvia en superficie biótica. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio indican que es necesario la adición de algún coadyuvante, entre ellos se deben considerar polímeros acrílicos (Quong y Nielsen, 2003) o surfactantes siliconados de la familia de los alquil alcoxilatos (Humble *et al.*, 2003).

Por último se evaluó el efecto de los formulados sobre la enfermedad a nivel de invernadero. La formulación mezcla base agua fue la única formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que generó un control de la enfermedad en invernadero con un porcentaje de área necrosada de 2,3%,

resultado muy similar al obtenido con el control positivo Dithane® en donde la enfermedad alcanzó un porcentaje de área necrosada del 1,0 %.

A pesar de los resultados promisorios encontrados en este estudio para los formulados de *B. subtilis* EA-CB0015 en el control de *M. fijiensis* y de la Sigatoka negra a nivel *in vitro* e invernadero, especialmente para la formulación mezcla base agua, los resultados relacionados con la tolerancia a los factores ambientales indican que es necesario trabajar en el mejoramiento de las formulaciones, especialmente enfocadas en estrategias que permitan mejorar la tolerancia a la radiación U.V., y la resistencia al lavado por lluvia, además que la formulación aumenta la viabilidad del microorganismo comparado con la cepa sin formular en suspensión bacteriana.

## 5. CONCLUSIONES:

Los formulados con base en *B. subtilis* EA-CB0015 almacenados a 25°C presentaron una mayor pérdida en la viabilidad entre 44 y 47% en comparación con aquellas almacenadas a 4°C que mostraron pérdidas insignificativas luego de 180 días de almacenamiento.

La formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 fue la formulación que presentó el mayor porcentaje de inhibición del tubo germinativo de *M. fijiensis* con un porcentaje inhibición de 66,1% sin diferencias significativas con el control químico (Dithane®) y biológico (Rhapsody®).

La formulación en emulsión fue la que presentó menor pérdida en la viabilidad de las esporas de *B. subtilis* EA-CB0015 al ser expuesta a la radiación U.V. (254 nm) con un  $t_{d50}$  de 37,4 minutos. La mezcla base agua y la suspensión bacteriana fueron los formulados más susceptibles a la radiación U.V. con un  $t_{d50}$  de 7,8 y de 6,7 minutos respectivamente. Esto comparado al control positivo Rhapsody® que mostró una reducción del 24,1% de la viabilidad celular durante los 180 minutos y un  $t_{d50}$  mayor que 180 minutos.

La formulación mezcla base agua de *B. subtilis* EA-CB0015 presentó la menor pérdida en la viabilidad al estar en contacto con las mezclas de tanque de fungicidas empleados en el control de la Sigatoka negra en comparación con la suspensión bacteriana con reducciones en la viabilidad de las esporas inferiores a 36,7% luego de 25 a horas a diferencia de la suspensión bacteriana que presentó un pico máximo de 75,21% de reducción en la viabilidad para todas las mezclas de fungicidas químicos evaluados. Sin tener en cuenta el efecto de los tipos de mezcla fungicida, la formulación mezcla base agua presentó una reducción de la viabilidad de 20,1 %, mientras que la suspensión bacteriana presentó una reducción del 36,4%.

La emulsión con base en *B. subtilis* EA-CB0015 fue la formulación que presentó la mejor adherencia a la superficie luego de realizada la prueba de lavado simulado con un porcentaje de adherencia de 16,9% sin diferencias significativas con el control positivo Rhapsody®. Los controles químicos Bravonil® y Dithane®, ambos fungicidas protectantes, presentaron un porcentaje de adherencia de 83,7% y 80,4% respectivamente.

La formulación mezcla base agua fue la formulación de *B. subtilis* EA-CB0015 que ejerció el mejor control de la enfermedad a escala de invernadero con un porcentaje de área necrosada de 2,29% sin diferencias significativas con el control químico Dithane® (1,0 %) y estadísticamente inferior al porcentaje de área necrosada presentado por el Rhapsody® (7,63%). La formulación emulsión fue la que presentó el menor control de las formulaciones de *B. subtilis* EA-CB0015 con un porcentaje de área necrosada de 10,9% el cual no difirió estadísticamente del control negativo (16,3%).

## Referencias.

1. ADAM, P.B. (1990). The potential of mycoparasites for biological control in plant disease. *Ann. Rev. Phytopatology* 29:59-72
2. AMIL, A.F.; HEANEY, S.P.; STRANGER,C; SHAW, M.W. (2007). Dynamics of QoI sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2002-2003. *Phytopatology* 97:1451-1557.
3. ANDREWS, J. H., y R. Harris. (2005). "The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces." (2000). (Cit. en: SALAZAR, L. "Estudio de la filosfera de musáceas alimenticias en el Urabá antioqueño". Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellin.
4. ARANGO, R.; CAÑAS GUTIÉRREZ, G. P.; CHONK, P.; STERGIOPOULOS, I.; KEMA, K.H.J.; RODRIGUEZ, E.; ANGARITA, M. (2010). Resistance to Chemical Fungicides in *Mycosphaerella fijiensis*: A molecular view. XIX Reunión internacional Accorbat. 8-12 Noviembre de 2010.
5. ARIAS, Pedro; DANKERS, Cora; LIU, Pascal; PILKAUSKAS, Paul. (2003) The World Banana Economy. Food and Agriculture organization of the United Nations. Roma(FAO).. Consultado en <http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e00.htm#Contents>. Junio 28 de 2010.
6. ANGEL, Luz Edith. (2010). Bióloga: Investigadora de CENIBANANO. AUGURA. Información personal.
7. ASTORGA, Y. (2010). The Environmental Impact of the Banana Industry: A Case Study of Costa Rica. <http://www.ibc2.org/text/PAPER2E.pdf>. Visitada Junio 10 de 2010.
8. AUDERSIK, T. AUDERSIK, G. (1996). *Biología: La Vida en la Tierra*. Universidad de Colorado - Denver. Editorial PEARSON. (Traducido por Ma. Marcela Ramirez E. Profesora de la UNAM).
9. BASHAN, Y. (1998). Inoculants of plant Growth-Promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16 No 4:729-770.
10. BECERRA, E. (2003). Manejo de Formulaciones de Dithane ® para el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Dow Agrosiences – boletín informativo.
11. BELALCAZAR, A. (1991). Estadísticas bananeras en Colombia. (Cit. en: Chica, R., Herrera, M., Jimenez, I., Lizcano, S., Montoya, J., Patino, L., Rodriguez, P. y Ruiz, L. (2004). "Impacto y manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del banano de exportacion en Colombia. Mexico, XVI Reunion Internacional ACORBAT).
12. BOYD-WILSON, K.S.H., PERRY, J.H., WALTER, M. (1998) Persistence and survival of saprophytic fungi antagonistic to *Botritis cinerea* on kiwifruit leaves. *Microbial Control of Plant Pathogens*. Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf. 1998:96-101.

13. BRAR, S. K.; VERMA, M; TYAGY, R.D.; VALÉRO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. (2006). Screening of different Adjuvants for Waste/water sludge-based *Bacillus thuringiensis* formulation. *Biological and Microbial Control* 99 (4):1065-1079.
14. BRAR, S. K.; VERMA, M; TYAGY, R.D.; VALÉRO, J.R.; SURAMPALLI, R.Y. (2007). *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge-Rheology and formulation studies. *Chemosphere* 67:674-679.
15. BRENT, K.J. (1995). Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?. GIPAF.FRAC Monograph No 1. Brussels, Belgium. P 48.
16. BURGESS, H. (1998). Formulation of microbial biopesticides, beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers. USA.
17. BURT, P. J. A.; RUTTER, J; GONZALES, H. (1997). Short-distance wind dispersal of the fungal pathogen causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Plant pathology* 46: 451-458.
18. CADAVID, A. (1984). Capacitación Ingenieros Agrónomos en el manejo y control de la Sigatoka Amarilla y Negra. Unibán – Apartadó.
19. CERÓN, J. y BRAVO A. (2004). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
20. CHICA, *et al.*, (2009). Efecto del Butóxido de Piperonilo y sus mezclas con fungicidas triazoles sobre el crecimiento *in vitro* de *M. fijiensis* Morelet. *Revista Tecnológica ESPOL*. Escuela Superior politécnica del Litoral. Guayaquil Ecuador.
21. CHIN, K.M., WIRZ, M. LARD, D. (2001). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant disease* 85:1264-1270
22. COLOMA R., B. y BARZOLA RUIZ, O. (2010). Desarrollo de un modelo porcentual para la evaluación de Sigatoka negra en condiciones de Invernadero. Centro de investigaciones Biotecnológicas del Ecuador. [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/title/desarrollomodelo-porcentual-evaluacion-sigatoka-negra-condiciones-invernadero/id/52145474.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/desarrollomodelo-porcentual-evaluacion-sigatoka-negra-condiciones-invernadero/id/52145474.html). Junio 21 de 2010.
23. CONWAY, K. E., MANESS, N. E., MOTES, N. E. (1997). Integration of biological and chemical controls for *Rhizoctonia aerial* blight and root rot of rosemary. *Plant disease*, 81. No 7.
24. CORREA PÉREZ, J. (1999). Guía Práctica para el cultivo del Banano. Material publicado por UNIBAN. Apartadó – Antioquía.
25. DRIKS, A., (2004). The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology* 94:1249-1251.
26. DONZELLI, B.G., CHURCHILL, A. C. (1997). A quantitative assay using mycelia fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology* 97:916-929.
27. DUPONT. Sigatoka Negra y Amarilla. (1982). Informe, pág. 17.

28. FOLDES, T., I. B´anhegyi, Z. Herpai, L. Varga, and J. Szigeti. (2000). "Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms." (Cit.en: Macagnan D, Romeiro R, Souza J and Pomela, A. "Isolation of Actinomycetes and Endospore-forming Bacteria from the Cacao Pod Surface and Their Antagonistic Activity against the Witches'Brom Black Pod Pathogens." *Phytoparasitica* 34,no.2 (2006):122-132).
29. FOURÉ, E. (1982). Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité varietale des bananiers et plantains e *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie desreies noires). I-Incubation et evolution de la maladie. *Fruits*, 37:749-771.
30. FRAVEL, D.R. (1988). Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. *Annual Reviews of Phytopathology* 26 :75-91
31. FU, G.; HUANG, S.; YE, Y.; WU, Y.; CEN, Z.; LIN, S. (2010). Characterization of a bacterial biocontrol strain B 106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose disease. *Biological Control*. S1049-9644(10)00094-0
32. GAUHL, F. (1989). Untersuchunge zur epidemiologie un okoloigie de shwarzen Sigatoka Krankheit (*Mycosphaerella fijiensis* MORELET) an Kockbananen (Musa sp) in Costa Rica. Thesis Univ. Gottingen (West Germany), 128 pág.
33. GAUHL, Friedhelm.(1992). Epidemiología y Ecología de la Sigatoka Negra en Plátano en Costa Rica traducido del Alemán. UPEB (Unión de países exportadores de Banano). Panamá.
34. GAVIRIA PAMPLONA, R. A. (2004). Evaluación de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado para optar por el título de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín.
35. GONZALES, M. (1987). Enfermedades del cultivo del banano. Oficina de publicaciones de la Universidad de Costa Rica. San José.
36. GONZALES, R; BUSTAMANTE, E; SHANNON, P; OKUMOTO,S; LEANDRO, G. (1996). Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo integrado de Plagas 40:6-11.
37. GRUPP, Bernhard; DOLLACKER, A; DOUGTHY, K; HAAS, M; HOLL, A. (2007). Protección de un Tesoro tropical: el banano. *Revista Correo de Bayer CropScience*. Enero de 2007.
38. GUTIÉRREZ GRISALES, Jaime. (1998). Control de Sigatoka Negra. Compilado. Boletín informativo. Dow Agrosiences de Colombia. 1998
39. ENTREVISTA con Jaime Gutiérrez Grisales. Asistente técnico y comercial de los productos de Dow® para banano en Urabá. Apartadó, Noviembre 1 de 2010.
40. GUZMAN, Mauricio. (2009). Investigación en control biológico de la Sigatoka negra del banano: Una prioridad Corbana. Boletín CORBANA No 79.

41. GUZMAN, Mauricio; WANG, Amy; ROMERO, Ronald A. (2001). Estrategias de aplicación de fungicidas Triazoles para el combate de la Sigatoka Negra en Banano (Musa AAA) y su efecto sobre el desarrollo de resistencia en *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Corbana 27(54):79-104.2001.
42. HUMBLE, G.D., KENNEDY, M.W., SIMPELKAMP, J.R., 2003. Use of nonspreading silicone surfactants in agrochemical compositions. US Patent Application 0,104,944.
43. INESTROZA *et al.* (2007). Proyecto Especial de Sigatoka Negra. Cartilla informativa de AUGURA y CENIBANANO. Urabá.
44. INYANG *et al.*, (2000). Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. Mycol Res 104(6):653–661
45. JACOBSEN, B.J., ZIDACK, N.K., LARSON, B. J. (2004). The role of *Bacillus* based biological agents in integrated pest management systems. Plant diseases. Phytopathology 94, 1272-1275.
46. JAROSKI, S. T. (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. Biocontrol 55:159-185.
47. JEFFRIES, D. (1995), Biology and ecology of microparasitids. Can. J Botanical Supply 1. 51284-51290.
48. JIMENEZ, J. M., GALINDO J. J., RAMIREZ, C. (1987). "Estudios sobre combate biológico de *M.fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epifitas". (Cit. en: Marin, D., R. Romero, M. Guzman, and T. Sutton. (2003). Black Sigatoka: An increasing Threat to Banana Cultivation. Plant disease 87, no. 3:208-223).
49. LIMA, G.; De CURTIS, F.; PIEDIMONTE, D. (2006). Integration of biocontrol yeast and thiabendazole protects stored apples from fungicide sensitive and resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Postharvest biology and technology 49 301-3017.
50. LOPEZ ARISMENDY, Elkin Darío. (2002). Evaluación en laboratorio de cepas de *Trichoderma* spp. Y *Gliocladium* spp. Para el control de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en banano y plátano. Trabajo de grado, requisito para obtener el título de maestría en biotecnología. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Posgrado en Biotecnología.
51. MARÍN D.H, ROMERO R.A., GUZMAN M, Sutton TB. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Dis 87:208–222
52. MARÍN, D., ROMERO, R. (1992). Control de la Sigatoka Negra. Corporación Bananera Nacional (Corbana). Boletín # 4.
53. MELNICK, Rachel; ZIDACK, Nina K.; BAILEY, Brian A.; MAXIMOVA, Siela N.; GUILTINAN, Mark; BACKMAN, Paul A. (2008) Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biological control 46:46-56.

54. MEREDITH, D.S., LAWRENCE, J. S. (1970). Black leaf streak of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Susceptibility of cultivars. *Trop. Agric.* 47:275-287.
55. MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, J.S. (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52(3):459-476.
56. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. (2005). La Cadena de Banano en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica: 1991-2005. [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_agronet/2005112143835\\_caracterizacion\\_banano.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112143835_caracterizacion_banano.pdf). Consultada en Junio 28 de 2010.
57. MIRANDA J. E. (1996). Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y en el exterior de la planta de banano. Tesis de posgrado. Centro Agronómico tropical de investigación y enseñanza para el desarrollo y la conservación. Turrialba, Costa Rica.
58. MURILLO R., LASA R., GOULSO D., WILLIAMS T., MUÑOZ D., CABALLERO P. (2003). Effect of tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua*. *Journal of Economic Entomology*. 96: 1668-1674.
59. ONGENA, M., and P. J. "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol." *Trends in Microbiology* 16, no. 3 (2008): 115-125.
60. PARNELL, M.; BURT, P.; WILSON, K. (1998). The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoka disease of banana and plantain. *International J. Biometeorology* (1998) 42:22-27.
61. PELAEZ MONTOYA, J. E. (1999). Evaluación de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a cuatro fungicidas empleados para el control de la Sigatoka negra. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia – sede Medellín.
62. PÉREZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; HERNÁNDEZ, L.; PÉREZ, M.. (2002). Effect of trifloxystrobin and azoxystrobin on the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop. Protection* 21:17-23
63. QUONG, D., NIELSEN, K.E. (2003). Adherent microcapsules. US Patent Application 0,040,552.
64. RAMIREZ, C. (2005). Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
65. RODRIGUEZ GAVIRIA, P. A. CAYÓN, G. (1996) Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Revista Agronomía Colombiana*. 26:2.
66. ROMERO, R.A. y SUTTON, T.B. (1997). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology* 87:96-100



67. SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W. y JACSON, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant Diseases. *Phytopatology*. 94:1267-1271.
68. SHILLINGFORD, C.A. (1989). Use of fungicides to control leaf spot disease in *Musa* en Fullerton, RA; STOVER, R.H. (1989) Sigatoka leaf spot disease of bananas. Proceedings of an international workshop. Sn José de C.R. Montpellier-Francia, INIBAP. 75-83
69. SIERRA, J. (1980). Naturaleza de la resistencia de razas de hongos a fungicidas de acción específica y sistemas de prevención. EN: Ascolfi informa vol 6, No 5:61, 69
70. SMITH, William F. (1993). Fundamento de la ciencia e ingeniería de materiales. McGraw-Hill. Segunda Edición. Bogotá-Colombia.
71. STOVER, R.H. (1971). A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola* LEACH). *Trop. Agriculture*. (Trinidad), 48:185-196.
72. STOVER, R.H. (1979) Field observations on benomyl tolerance in ascospores of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 69:500-502.
73. STOVER, R.H. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and Platains. *Plant Disease*. 64 (8): 750-755
74. SUNDIN, G. W. (2002). "Ultraviolet radiation on leaves its influence on microbial communities and their adaptation.". (Cit. en: WHIPPS, J. M., P. HAND, D. PINK, y G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology*, 2007: 1744-1755).
75. SUDIN., G. W., y J. L. Jacobs. (1999). Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field grown peanut (*Arachis hypogaea* L). (Cit. en: Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink, and G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology*, 2007: 1744-1755)
76. TALAVERA, S.; BUSTAMANTE, R.; GONZALEZ, E y V. SANCHEZ, V. (1998). "Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanólíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*." *Manejo Integrado de Plagas* 47 (1998): 24-30.
77. UNITED BRANDS COMPANY. (1984) Bananos: Manual para controlar la Sigatoka. N.A. ; N.E.
78. VINDAS, R.; ORTIZ, F.; RAMIREZ, V. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Rev. biol. trop*, sep. 2004, vol.52, no.3, p.601-609. ISSN 0034-7744.
79. ZULOAGA, Catalina M; PATIÑO, Luis Fernando, COLLAZOS, Juan C. (2004). INTEGRACIÓN DE INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON BACTERIAS QUITINOLÍTICAS EN EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN BANANO. *Rev. Fac. Nal.Agr. Medellín* v.60. n.2. Julio/Dic. 2007.

