

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Evaluación del Efecto del Butóxido de Piperonilo y de sus
Mezclas con Tres Fungicidas Triazoles sobre el Crecimiento de
Mycosphaerella fijiensis Morelet en Condiciones de Laboratorio”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentada por:

Eduardo José Chica Martínez

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2005

AGRADECIMIENTO

A todos quienes de una manera u otra colaboraron en la elaboración de este trabajo.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Eduardo Rivadeneira P.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ing. Daniel Navia M.
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Haydeé Torres C.
VOCAL

Ing. Miguel Quilambaqui J.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Eduardo J. Chica Martínez

RESUMEN

Se evaluó el efecto del Butóxido de Piperonilo (BOP), un conocido sinergista de insecticidas, sobre el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis* para validar la hipótesis que supone que este compuesto posee un efecto antifúngico debido a sus interacciones con el Citocromo P-450, el mismo sitio de acción de los fungicidas triazoles. Se desarrollaron ensayos en los que se evaluó el efecto del BOP en solitario y mezclado con tres fungicidas triazoles.

Se logró determinar que el BOP posee una acción antifúngica débil sobre el crecimiento de este hongo cuando este se desarrolla a partir de sus esporas sexuales (ascosporas), mientras que posee un doble efecto, inhibitorio y estimulante, cuando se desarrolla a partir de sus esporas asexuales (conidias). Por otra parte, el BOP modifica la acción fungicida de los triazoles incrementando en algunos casos su efectividad antifúngica y deprimiéndola en otros. Se determinó que la modificación del efecto de los triazoles debido a la mezcla con BOP depende del triazol con el cual se realiza la mezcla y la proporción en que esta se realiza. El BOP no presenta niveles adecuados de control; sin embargo, existen potencialidades en los efectos observados cuando fue mezclado con los triazoles.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	I
INDICE GENERAL.....	II
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
1. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A LOS FUNGICIDAS.....	3
1.1. Antecedentes y situación actual.....	4
1.2. Mecanismos de desarrollo de resistencia y tolerancia a fungicidas.....	8
1.3. Alternativas para el manejo de la resistencia a los fungicidas.....	13

1.4. Desarrollo de resistencia por parte de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a los fungicidas en el Ecuador	19
--	----

CAPÍTULO 2

2. LOS FUNGICIDAS TRIAZOLES.....	23
2.1. Generalidades.....	24
2.2. Mecanismo de acción: interacción con el metabolismo de los esteroides.....	25
2.3. Desarrollo de resistencia a los fungicidas Triazoles: mecanismos de resistencia.....	30

CAPÍTULO 3

3. EL BUTÓXIDO DE PIPERONILO.....	43
3.1. Generalidades.....	43
3.2. Relación entre el Butóxido de Piperonilo y las enzimas Citocromo P-450.....	51
3.3. Mecanismo de acción y aplicaciones.....	53

CAPÍTULO 4

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
------------------------------	----

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS 75

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 92

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

AA	Agar Agua
BOP	Butóxido de Piperonilo
DMI's	<i>Demethylation Inhibitors</i> (Inhibidores de la Demetilación)
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FMN	Flavín Mononucleótido
FRAC	<i>Fungicide Resistance Action Committee</i> (Comité de Acción contra la Resistencia a los Fungicidas)
MDP	<i>Methylen-dioxy-phenyl</i> (Metilén-dioxi-fenil)
NAD	Nicotín Adenín Dinucleótido
NADP	Nicotín Adenín Dinucleótido Fosfato
PDA	Papa Dextrosa Agar
PBO	<i>Piperonyl Butoxide</i>
SBI's	<i>Sterol Biosynthesis Inhibitors</i> (Inhibidores de la Biosíntesis del Esterol)

SIMBOLOGÍA

CI_{50}	Concentración Media Inhibitoria
cm^3	Centímetro Cúbico
DL_{50}	Dosis Letal Media
ml	Mililitro
μm	Micrómetro
ppm	Partes por millón
\overline{Sd}	Error estándar entre medias de tratamientos
\overline{x}	Media

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Ocurrencia de resistencia probada a fungicidas en varios cultivos.....	7
TABLA 2	Principales mecanismos de resistencia a fungicidas.....	13
TABLA 3	Posibles Mecanismos de Resistencia a Fungicidas Triazoles.....	38
TABLA 4	Propiedades Físico-Químicas del PBO.....	47
TABLA 5	Valores de DL50 para Toxicidad Aguda del PBO.....	50
TABLA 6	Descripción de los Niveles del Factor Ingrediente Activo.....	68
TABLA 7	Descripción de los Niveles del Factor Proporción de Mezcla.....	70
TABLA 8	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento del Tubo Germinativo de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	76
TABLA 9	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento del Tubo Germinativo de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	77
TABLA 10	Descriptores de las Curvas de Sensibilidad de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	78
TABLA 11	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento de Colonias Cultivadas a partir de Conidias de <i>M. fijiensis</i>	79
TABLA 12	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento de Colonias Cultivadas a partir de Conidias de <i>M. fijiensis</i>	80
TABLA 13	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento del Tubo Germinativo de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	82
TABLA 14	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento del Tubo Germinativo de Ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	83
TABLA 15	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento de Colonias Cultivadas a partir de Conidias de <i>M. fijiensis</i>	84
TABLA 16	Porcentajes de Inhibición Promedio del Crecimiento de Colonias Cultivadas a partir de Conidias de <i>M. fijiensis</i>	85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 Patrones de Resistencia a Fungicidas.....	7
FIGURA 2.1 Estructura química del Fenbuconazol.....	25
FIGURA 2.2 Citocromo P-450	26
FIGURA 2.3 Interacción entre la molécula de fungicida y la enzima estero1-14-demetilasa.....	29
FIGURA 2.4 Sensibilidad de <i>Rynchosporium secalis</i> al Triadimenol y Propiconazol.....	39
FIGURA 3.1 Estructura Molecular del Butóxido de Piperonilo.....	46
FIGURA 3.2 Mecanismo de Inhibición Hipotético del PBO sobre el Citocromo P-450.....	56
FIGURA 5.1 Curva de Sensibilidad de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	77
FIGURA 5.2 Curva de Respuesta de Conidias de <i>M. fijiensis</i>	81

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de mecanismos de resistencia a las armas químicas utilizadas en el control y manejo de plagas y enfermedades de los cultivos es un problema que genera grandes preocupaciones en productores e investigadores que tratan de desarrollar herramientas adecuadas para evitar los daños ocasionados por estos organismos.

La enfermedad de la Sigatoka Negra es el principal problema fitosanitario en las modernas plantaciones de banano en todos los países donde esta fruta se produce. A pesar de la importancia económica del cultivo, y de exhaustivos esfuerzos de centros de investigación, aún no ha sido posible encontrar un control efectivo para el problema. Tradicionalmente, la principal estrategia de control de problemas fitosanitarios en los cultivos ha sido la lucha química. El caso del banano no ha sido la excepción, y desde la aparición de la enfermedad de la Sigatoka Negra esta lucha se ha venido intensificando cada vez más.

De entre las armas químicas utilizadas para combatir al agente causal de la Sigatoka Negra los fungicidas Triazoles merecen particular atención debido a su amplia utilización y aceptable control de la enfermedad. No obstante, debido a la aparición de indicadores de resistencia a este tipo de compuestos ha sido necesario desarrollar nuevas moléculas de principios activos para

controlar el riesgo de la aparición de una cepa resistente a los controles químicos actuales.

El Butóxido de Piperonilo ha sido ampliamente estudiado y aplicado durante años como sinergista de la acción de los insecticidas en la lucha contra las plagas de los cultivos, y muy poco se conoce sobre su efecto sobre otros organismos. No obstante, debido a su mecanismo de acción basado en interferencias sobre las funciones del Citocromo P-450 es posible imaginar la posibilidad de que esta molécula pueda tener una acción fungicida debido a que comparte el sitio de acción que utilizan los fungicidas Triazoles en el proceso de biosíntesis del ergosterol en el metabolismo de los hongos.

El objetivo de este trabajo es validar la hipótesis que supone que el Butóxido de Piperonilo posee acción fungicida sobre el desarrollo de los hongos y establecer la relación existente entre este compuesto y los fungicidas Triazoles, a través de la evaluación de su efecto puro y en mezcla con dichos fungicidas sobre el desarrollo micelial en el agente causal de la Sigatoka Negra del banano; para lograr este objetivo se utilizaron procedimientos de laboratorio estandarizados para establecer el efecto del Butóxido de Piperonilo y sus mezclas tanto en el desarrollo micelial a partir de estructuras reproductivas sexuales, como a partir de estructuras reproductivas asexuales en etapas tempranas de su desarrollo.

CAPÍTULO 1

1. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A LOS FUNGICIDAS.

En la actividad agrícola el ámbito de la Sanidad Vegetal es un factor determinante a tener en cuenta en la planificación de cualquier cultivo. La gran variabilidad genética y la rápida velocidad de adaptación a los cambios en los microorganismos, los han convertido en los enemigos más difíciles de enfrentar por el hombre en defensa de las plantas cultivadas. En el caso particular de los hongos, la situación no se puede considerar estable, la evolución de mecanismos de resistencia a fungicidas ha sido tangible desde hace más de veinticinco años y aún no ha sido eficazmente comprendida ni controlada (4). La necesidad de profundizar los conocimientos que permitan acortar la brecha que imposibilita el control eficaz de este problema, se convierte

claramente en una necesidad imperante, demandando así esfuerzos tecnológicos adecuados para satisfacerla.

1.1. Antecedentes y Situación Actual.

Desde hace más de 200 años el hombre ha utilizado una variedad de compuestos químicos para proteger a las plantas cultivadas del ataque de los microorganismos fitopatógenos (1,4). Desde aquellos tiempos hasta hoy, el desarrollo de la química agrícola ha experimentado notables avances, sobre todo en el campo de los compuestos fungicidas; estos avances no han sido resultado de la casualidad o de la investigación pura, sino que han sido la respuesta al más rápido desarrollo evolutivo de los microorganismos fitopatógenos, de forma que, el largo camino que separa a los antiguamente usados compuestos cúpricos protectantes, de las modernas estrobirulinas, ha sido en gran parte trazado por la necesidad de respuesta ante un enemigo más hábil en el arte de adaptarse a condiciones adversas (4).

El desarrollo de nuevos compuestos fungicidas se intensificó después de la Segunda Guerra Mundial con la industrialización de la agricultura y sus consecuentes problemas fitosanitarios.

Actualmente existen en el mercado de los fungicidas cerca de 135 compuestos diferentes (4). El mercado de estos compuestos en conjunto representó a nivel mundial en 1993 un volumen de 4.7 billones de dólares considerando únicamente las ventas al consumidor final (4). El mismo año el Ecuador importó 21.3 millones de dólares en fungicidas; en el 2003, la importación de fungicidas en el Ecuador representó 50.3 millones de dólares (26); la misma fuente indica que el incremento en el consumo de fungicidas y bactericidas durante la década de 1990 hasta el 2000 fue de cerca del 315%, representado un aumento de 2406Tm en el consumo.

Estas estadísticas permiten imaginar una disminución en la sensibilidad de los hongos fitopatógenos a los compuestos fungicidas, ya que considerando el incremento normal en la superficie cultivada nacional, los procesos inflacionarios y los ocasionales incrementos en la presión de infección de enfermedades en campo, aún queda una brecha que denota un incremento en el nivel de uso de estos productos, posiblemente debido a su pérdida de eficacia.

En la mayoría de los casos, el nivel de eficacia de los fungicidas se mantiene todavía en niveles bastante aceptables (>90%) y la relación costo-beneficio que el productor recibe por el uso de estos compuestos es generalmente de 1:3 (4). A pesar de lo antes mencionado, y considerando la naturaleza de los hongos fitopatógenos, los riesgos son aún altos. En algunos casos de resistencia probada a ciertos fungicidas, la eficacia de uso de diversas familias de compuestos fungicidas ha motivado al descarte de algunas moléculas dentro de los programas de manejo fitosanitario; como en el caso del control de la enfermedad del Moho Gris de la vid, causada por *Botrytis cinerea*; o, de la enfermedad de la Sigatoka Negra del Banano causada por *Mycosphaerella fijiensis*, en donde los programas de manejo dependen mayoritariamente de la alternancia de dos o tres grupos de compuestos (4).

La fragilidad de este equilibrio y el elevado nivel de dependencia de tan pocas alternativas para el control de los hongos fitopatógenos se han manifestado en más de una ocasión causando graves perjuicios económicos. La tabla 1 muestra un resumen histórico de los casos en que se ha

presentado resistencia probada a un determinado compuesto o grupo de compuestos fungicidas.

TABLA 1
OCURRENCIA DE RESISTENCIA PROBADA A FUNGICIDAS EN
VARIOS CULTIVOS

Año (aprox.)	Fungicida o Clase de Fungicida	Años de Uso Comercial ¹	Enfermedad	Agente causal
1964	Organo-mercúricos	40	Raya y Mancha foliar de los cereales	<i>Pyrenophora spp.</i>
1970	Benzimidazoles	2	Varias	Varios
1971	2-amino-pirimidinas	2	Mildew polvoriento del pepino y de la cebada	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>Erysiphe graminis</i>
1980	Fenilamidas	2	Tizón tardío de la papa y Mildew lanoso de la vid	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Plasmopara viticola</i>
1982	Dicarboximidias	5	Moho Gris de la vid	<i>Botrytis cinerea</i>
1982	Inhibidores de la Demetilación del esterol (DMI's)	7	Mildew polvoriento del pepino y de la cebada	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>Erysiphe graminis</i>

¹ Años de uso comercial hasta la manifestación de resistencia
Modificada. Brent, K. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed?. 1995.

A nivel mundial varios organismos relacionados con el control de este problema monitorean y cuantifican el riesgo de que se

expresen un nuevo mecanismo de resistencia a un producto comercial; así mismo, movilizan esfuerzos para entender mejor estos mecanismos y buscar nuevas armas que permitan elevar el nivel de control de la resistencia (12).

1.2. Mecanismos de Desarrollo de Resistencia a Fungicidas.

La expresión de resistencia a un determinado agente fungicida es el resultado de modificaciones discretas en la constitución genética de una población de hongos. Básicamente, estas modificaciones que permiten el desarrollo de resistencia están referidas al aumento de la frecuencia de un determinado gen o grupo de genes dentro de los individuos de una población. Según varios estudios, estos genes que codifican la expresión de mecanismos de resistencia se han encontrado siempre dentro de las poblaciones naturales, pero la posesión de dicho gen de baja frecuencia no representa ninguna ventaja evolutiva; hasta que debido a la *presión de selección* ejercida por la molécula de fungicida, su frecuencia aumenta en la población y la convierte en resistente a dicho compuesto (4).

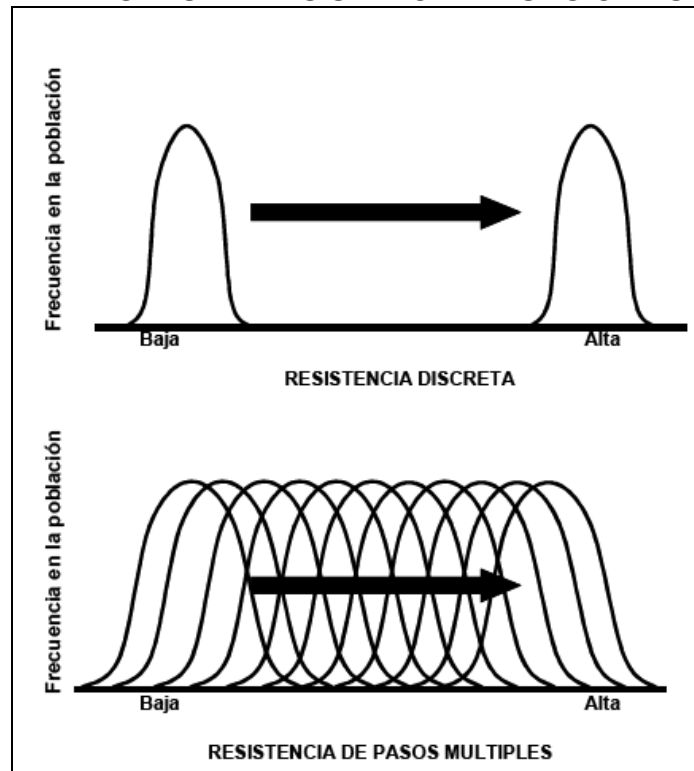
Respecto al origen de estos genes codificadores de mecanismos de resistencia, se puede considerar que la

principal vía de manifestación dentro de la población son las mutaciones, las cuales ocurren de forma natural en todos los organismos y también de forma artificial. Una vez que el gen mutante codificador de resistencia se ha expresado, este se convierte en un gen heredable debido las características reproductivas de los hongos (4,11).

Teniendo en cuenta los orígenes de los mecanismos de resistencia a los fungicidas, es importante mencionar que el hecho de que un solo gen codifique de la expresión de todo el mecanismo de resistencia necesario para soportar la *presión de selección* ejercida por el fungicida, genera diferencias en el patrón de comportamiento de la población con respecto al caso en que varios genes son responsables de pequeños efectos aditivos que confieren la resistencia. En el primer caso, la población pasa *súbitamente* de una condición “sensible” a una condición “resistente”, por otra parte, en el segundo caso la transición de la población de un estado “sensible” a un estado “resistente” es *gradual*; esto se debe a que la probabilidad de que se produzca una mutación en un solo gen es sumamente más alta a que se produzcan mutaciones en dos o más genes a la vez (4). En el primer caso, el patrón de comportamiento de la

resistencia de la población se lo conoce como *Patrón de Resistencia Discreta*, referida a la expresión de un gen único o Gen Principal; en el segundo caso, el patrón de comportamiento de la resistencia de la población se lo conoce como *Patrón de Resistencia de Pasos Múltiples*, referido a la expresión de varios genes o expresión Poligénica (4,11) (Figura 1.1). Con respecto a este último patrón, es necesario mencionar que aunque esta teoría es ampliamente aceptada, no ha sido completamente comprobada a través de la investigación (4).

FIGURA 1.1
PATRONES DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS



Modificada. Brent, K. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed?. 1995.

Teniendo en cuenta el origen genético de la resistencia, es fácil comprender que existan numerosos mecanismos para expresarla en un determinado hongo (4,30). Hasta ahora, algunos mecanismos de resistencia a determinados grupos de fungicidas han sido extensamente estudiados y aceptablemente comprendidos, como el caso de los mecanismos de resistencia a los Benzimidazoles, Difenilamidas, Carboxanilidas y fungicidas Fosforotiolados; no obstante, aún quedan otros grupos de los que se sabe muy poco (o nada) respecto a los mecanismos mediante los cuales los hongos expresan resistencia a ellos (4).

Entre los principales mecanismos de resistencia se pueden considerar (4):

- a. Alteraciones bioquímicas en el sitio de acción que reducen su sensibilidad al producto.
- b. Modificaciones en la vía metabólica del producto para evitar que llegue al sitio de acción.
- c. Desactivación metabólica del fungicida.
- d. Excreción o expulsión rápida de la molécula fuera del hongo.

El mecanismo de resistencia más común es la modificación bioquímica del sitio de acción del fungicida (4,30). Esta modificación es generada por un cambio en la secuencia genética codificadora de la enzima o proteína que constituye el sitio de acción en el hongo. De acuerdo a este criterio, modernamente los fungicidas se han clasificado en dos grupos: fungicidas “multi-sitio” (e.g. Carbamatos) y fungicidas “uni-sitio” o “sitio-específicos” (e.g. Triazoles) (4). Por otra parte, considerando los orígenes de la resistencia es fácil comprender que los fungicidas multi-sitio son menos propensos a perder su eficacia por la aparición de mecanismos de resistencia en comparación con los fungicidas uni-sitio (4,5).

Desventajosamente, en los últimos años las compañías fabricantes de fungicidas han desarrollado más fungicidas uni-sitio, explicando así que los fungicidas más antiguos sean más efectivos que los modernos en cuanto a resistencia se refiere.

Algunos de los mecanismos de resistencia a grupos de fungicidas se encuentran resumidos en la tabla a continuación.

TABLA 2
PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS

Fungicida o Grupo Fungicida	Mecanismo de resistencia
Fungicidas Organo Mercúricos	Detoxificación mediada por ligandos
Benzimidazoles	Alteración del sitio activo (β -tubulina)
Kasugamicina	Alteración del sitio activo (ribosomas)
Fungicidas Fosforotiolados	Detoxificación metabólica
Fenilamidas	Alteración del sitio activo (ARN polimerasa)
Inhibidores de la demetilación ¹	Incremento de la tasa de expulsión Alteración del sitio activo Sobreproducción del sitio activo
Carboxanilidas	Alteración del sitio activo (succinato-ubiquinona oxidoreductasa)

¹ No claramente confirmado en aislamientos provenientes del campo.
Modificada. Brent, K. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed?. 1995.

1.3. Alternativas para el Manejo de la Resistencia a los Fungicidas.

El desarrollo de resistencia a compuestos fungicidas es una consecuencia evolutiva en los hongos, por lo que la eliminación de este fenómeno es muy poco probable; no obstante, es posible hablar de control de la resistencia, no en términos erradicativos, sino en términos preventivos. Para este efecto, en todo el mundo se han creado comités y grupos de trabajo

encargados de analizar esta problemática (e.g. FRAC, PMRA, GCPF) (11).

Las medidas de prevención de la expresión de resistencia son concordantes en la mayoría de las recomendaciones de los distintos comités; básicamente, las recomendaciones hechas para reducir a niveles aceptables el desarrollo de resistencia en organismos fitopatógenos se resumen en seis directrices (4), analizadas a continuación.

1.- Evitar el uso de productos *en solitario*.- Esta recomendación viene referida al hecho de que la probabilidad de que un compuesto fungicida sufra una reducción en su efectividad permanentemente, depende en gran medida, de que existan individuos resistentes luego de su aplicación, capaces de reproducirse y traspasar su resistencia a la siguiente generación. Al aplicar fungicidas en mezclas se incrementa el nivel de control por la adición de los efectos de los dos productos; no obstante, la selección de los productos que participan en la mezcla debe ser adecuadamente elegida, principalmente por los riesgos de trabajar con familias que exhiben resistencia cruzada, o

familias particularmente propensas a expresar individualmente reducción de su efectividad (por ejemplo, mezclas de dos fungicidas uni-sitio). De cualquier forma y considerando los aspectos últimamente señalados, la probabilidad de que el patógeno exprese resistencia a un compuesto seguirá siendo mayor cuando este se aplica en solitario.

2.- Restringir el número de aplicaciones de un mismo

compuesto.- Esta recomendación viene referida al hecho de que al reducir la exposición del patógeno al compuesto fungicida en riesgo de perder efectividad, se reduce la *presión de selección* en la población, al eliminar parcialmente el estímulo seleccionador. Esto implica que las aplicaciones necesarias para alcanzar el control comercial en un cultivo deberán contener dos o tres compuestos en rotación continua durante el ciclo productivo.

3.- Utilizar las dosis recomendadas por los fabricantes del

producto.- Respecto a esta recomendación aún no se han podido esclarecer adecuadamente los efectos de utilizar dosis incrementadas o disminuidas. Los estudios e

investigaciones han presentado resultados ambiguos; en algunos casos, el uso de dosis mayores ha inducido el desarrollo de resistencia en determinados patógenos en ciertos cultivos y localidades, mientras que en otras ocasiones, dosis menores han generado el mismo efecto; por lo que la recomendación es mantenerse en un nivel neutral ajustado a las recomendaciones del fabricante, las cuales están basados generalmente en ensayos realizados bajo condiciones locales de cada región donde se utiliza el producto.

4.- Evitar las aplicaciones erradicantes.- Últimamente, se han venido elaborando programas de control basados en el uso de “umbrales de aplicación”, donde una vez expresado el umbral continúa una aplicación con un producto de características erradicantes. El problema de esta estrategia de manejo radica en que en ocasiones permite que las poblaciones de microorganismos se desarrollen hasta niveles en las que son más propensas a expresar resistencia (por lo general madurez reproductiva). En contraste, las estrategias de control *profilácticas* basadas en aplicaciones programadas de determinados productos

mantienen siempre los niveles de desarrollo de las poblaciones bajas, evitando que alcancen la madurez reproductiva y, por tanto, evitando la transmisión de la resistencia.

5.- Aplicar un Manejo Integrado de Enfermedades.-

El control de las enfermedades, de la misma forma que ya fue aceptado en el campo de la entomología agrícola, no depende únicamente de una sola estrategia de control, sino de la aplicación racional de todas las medidas que permitan contrarrestar un efecto no deseado causado por un agente biótico; en este aspecto, es necesario reforzar los controles químicos tradicionales con prácticas culturales y aspectos de manejo que permitan mantener a las poblaciones de patógenos en niveles económicamente aceptables.

6.- Diversidad Química de los Ingredientes Activos.-

La investigación clásica en la búsqueda de nuevos ingredientes activos y mecanismos de acción representará claramente una ventaja en la lucha contra los organismos fitopatógenos, al incrementar los recursos que se pueden utilizar para ejercer control sobre el problema. En este aspecto, no

necesariamente se requiere la aparición de nuevas moléculas que exhiban niveles de control superiores a los convencionales, sino que simplemente, presenten una adecuada efectividad dentro del promedio general sobre patotipos reconocidos como resistentes. Es ya sabido que tarde o temprano todo control produce una reacción en el agente a controlar y que el control efectivo no depende sólo de una herramienta sino de la combinación de varias, como ya se mencionó anteriormente.

Las recomendaciones descritas anteriormente resumen muy básicamente los lineamientos de los distintos grupos de trabajo que monitorean la situación de los microorganismos fitopatógenos frente a las armas químicas utilizadas convencionalmente; no obstante, cada recomendación no puede ser considerada como una estrategia aislada, sino que el conjunto de ellas será el que permita alcanzar el control esperado (4). Por otra parte, se debe mencionar que la investigación local y regional, el intercambio de información y las políticas regulatorias respecto a la aplicación de productos en los distintos países, son necesarias al momento de establecer un sistema de control efectivo sobre la expresión de

resistencia en los hongos y microorganismos fitopatógenos (5,12).

1.4 Desarrollo de Resistencia a Fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis*.

Mycosphaerella fijiensis, el agente causal de la enfermedad de la Sigatoka Negra del Banano, es un hongo ascomiceto perteneciente al orden de los Dothidiales. Se encuentra ampliamente diseminado en todos los países productores de la fruta en el mundo. Fue reconocido por primera vez en el valle de Sigatoka en la costa sur-oriental de Viti Levu en Fiji en 1963 (23). En 1977 fue por primera vez identificado en Latinoamérica, en Honduras (23), desde donde se ha diseminado rápidamente en todo el subcontinente. Actualmente se la considera como una de las fitopatologías epifíticas más importantes (1,24).

El principal síntoma de la enfermedad es el necrosamiento progresivo del área foliar, afectando consecuentemente el rendimiento y provocando maduración prematura de la fruta (1,24). Existen reportes que estiman pérdidas debido a la enfermedad en el orden del 50% de la producción (24). El hongo se reproduce por vía sexual y asexual, produciendo

ascosporas y conidias respectivamente y el principal medio de diseminación de la enfermedad es el agua y el aire (1,24). Actualmente las principales medidas de control de la enfermedad incluyen el control químico y cultural (23,24).

Tradicionalmente, el control químico de la enfermedad se ha caracterizado por la rotación de dos o tres familias de fungicidas en ciclos de aplicación periódicos. Los fungicidas sistémicos han sido ampliamente preferidos en este control (23,24).

Uno de los primeros grupos utilizados para el control de la enfermedad fue el grupo de los Benzimidazoles; así mismo, fue el primer grupo para el cual *M. fijiensis* expresó resistencia probada, esto ocurrió en Costa Rica en 1991 después de 10 años de uso intensivo del ingrediente activo Benomil (23). Como consecuencia de la aparición de este problema, el uso de Benzimidazoles para el control de *M. fijiensis* se descartó de los programas de fumigación en 1995 y en su lugar se incrementó el uso de Inhibidores de la Demetilación (Demethylation Inhibitors, *DMI's*) que ya se venían usando en rotación desde la década de 1980 (23). El ingrediente activo

Propiconazol fue el primer DMI utilizado para el control de la Sigatoka Negra (23).

Por otra parte, desde 1992 existen referencias acerca de la pérdida de la efectividad de este ingrediente activo en el control de la enfermedad en Costa Rica (23). En 1994 finalmente se detectó una reducción de la sensibilidad de *M. fijiensis* al Propiconazol en dos poblaciones del patógeno, la una con un historial de aplicaciones de Propiconazol de siete años y la otra sin historial de aplicación del producto (23). A pesar de que la resistencia al producto fue expresada, ésta no presentó el mismo patrón de comportamiento que presentó la resistencia a los Benzimidazoles, por lo que su uso no fue discontinuado sino que fue complementado con programas de pronóstico fitopatológico y prácticas culturales (23).

Finalmente, en 1997 se introdujo en los programas de manejo un nuevo grupo de fungicidas llamados Estrobirulinas (23). El desempeño de este nuevo grupo ha sido monitoreado desde 1998 para determinar la expresión de resistencia de forma temprana (23). A pesar de su buen nivel de control de la enfermedad en el campo, en 2002 se observó una reducción de

la sensibilidad de *M. fijiensis* a las estrobirulinas, posiblemente generada por una mutación puntual en la secuencia codificadora de una de las proteínas del Citocromo b (23). El uso de Estrobirulinas, además de los potenciales riesgos de resistencia, se encuentra también restringido parcialmente por el costo que representa para el productor la adquisición del producto, el cual tiene un precio muy por encima del de otros fungicidas.

Actualmente se considera que un mejor conocimiento del comportamiento del patógeno y de su constitución genética son líneas de investigación que pueden permitir encontrar una solución más efectiva al problema del manejo de la enfermedad. Así mismo es comúnmente aceptado que el programa de manejo de la enfermedad no se puede restringir únicamente a la lucha química, sino que debe ser la adecuada combinación de todas las herramientas disponibles, incluyendo el control cultural y el mejoramiento genético (4). No obstante, es necesario reconocer que el control químico constituirá un aporte importante a este equilibrio de fuerzas.

CAPÍTULO 2

2. LOS FUNGICIDAS TRIAZOLES.

Como se mencionó en el capítulo anterior, el control de la enfermedad de la Sigatoka Negra actualmente se fundamenta en el control químico y el monitoreo continuo de las plantaciones. Dentro del control químico, los fungicidas Triazoles, Morfolinas y Estrobirulinas son los que han demostrado mayor efectividad en el control de la enfermedad; no obstante, los fungicidas Triazoles han sido los más utilizados para controlar la enfermedad en nuestro medio, después del descarte de los Benzimidazoles.

La mayor demanda por este tipo de fungicidas en nuestro país la tienen los sectores bananeros y florícolas, mientras que, a nivel internacional su uso se reparte en muchos más cultivos. En 2001, el consumo de estos fungicidas en nuestro país representó cerca del 10% del consumo nacional de fungicidas, lo que equivale a 140Tm,

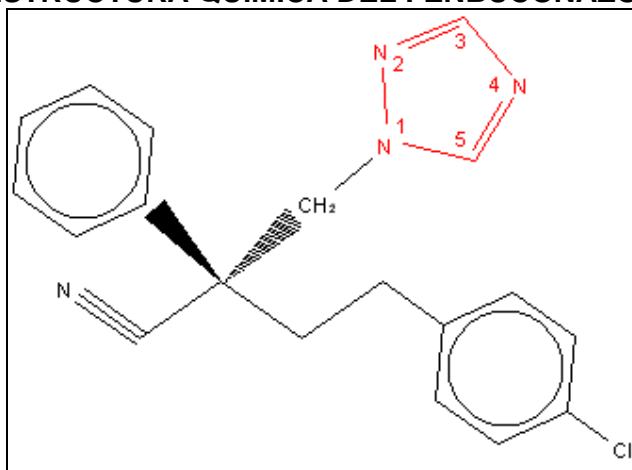
nivel en el que ha permanecido relativamente estable desde 1998 (26).

2.1. Generalidades.

Los fungicidas Triazoles pertenecen a la Clase I de los fungicidas Inhibidores de la Biosíntesis del Esterol (Sterol Biosynthesis Inhibitors, *SBI's*), al grupo de los Inhibidores de la Demetilación del Carbono 14 (DMI's) (Código FRAC: 3) (13). Es uno de los grupos fungicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo para en control de enfermedades en numerosos cultivos; así como también, en el tratamiento de enfermedades fungosas en animales y humanos (22).

Los fungicidas Triazoles deben su nombre al anillo aromático que poseen en su estructura molecular, el cual representa el sitio activo del fungicida (Figura 2.1) (22,27). Además del anillo Triazol, estos fungicidas presentan otros grupos funcionales que potencian la actividad del Triazol (e.g. Fenil), y en algunos casos tienen efectos reguladores en el crecimiento de los vegetales (e.g. hidroxilos) (25,27).

FIGURA 2.1
ESTRUCTURA QUÍMICA DEL FENBUCONAZOL*



*En rojo se muestra el anillo Triazol

También es importante notar, que las características estereoquímicas de estos compuestos pueden incrementar su efecto, debido a la forma en la que estos fungicidas interactúan con el sitio de acción en el hongo (27).

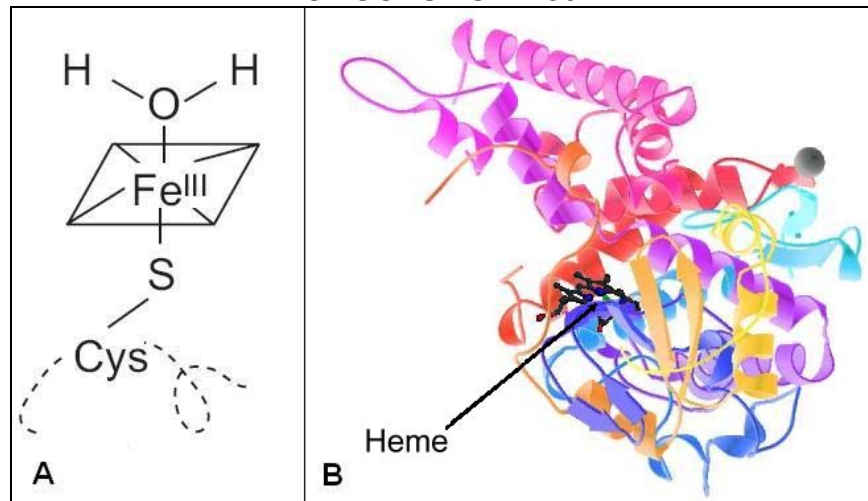
2.2. Mecanismo de Acción: Interacción con el metabolismo de los esteroides.

Los Triazoles ejercen su acción fungicida al inhibir la actividad de la enzima *esterol NADPH:oxígeno oxidoreductasa* (EC. 1.14.13.70; estero1-14-demetilasa), perteneciente al Complejo Citocromo P-450 (CYP) (21,22,25,27). Esta enzima es la encargada de catalizar la demetilación del C14 durante la transformación del Lanosterol en Ergosterol (Anexo 1) (27,33);

como consecuencia, se produce la acumulación de 14-metil-esteroles en lugar de esteroles en la membrana celular del hongo, perjudicando la viabilidad fisiológica de la misma (21,22,27).

De forma general, las enzimas citocromo P-450 son enzimas tipo heme-tiolato, donde el grupo prostético es siempre un átomo de hierro unido a residuos azufrados de Cisteína (*Cis*) (Figura 2.2) (31).

FIGURA 2.2
CITOCROMO P-450



A. Grupo Heme-Tiolato de las enzimas Citocromo P-450.

B. Enzima esteroles-14-demetilasa.

Modificadas. Werk-Reichhart & Feyereisen. Cytochromes P-450: A Success Story. 2000. / <http://www.brenda.uni-koeln.de>

Las reacciones tradicionales de esta familia de enzimas son las reacciones de oxidación en las se que utiliza una molécula de

oxígeno como agente oxidante, además de un sistema adecuado de cofactores (usualmente NAD, NADP, FAD, FMN y sus formas reducidas) que actúan como donadores y aceptores de electrones (14,31).

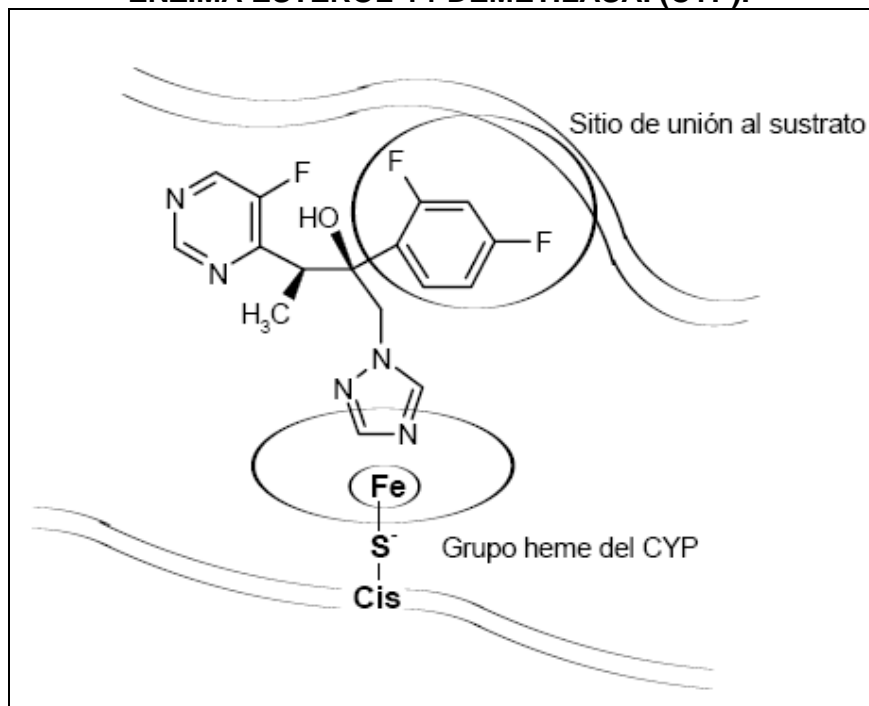
En la naturaleza la cantidad de reacciones catalizadas por este tipo de enzimas es realmente amplia, llegando a reportarse su actividad sobre más de mil sustratos distintos (14), sus funciones principales son la detoxificación de sustancias xenobióticas, la catálisis de reacciones del metabolismo endógeno (principalmente esteroides, sales biliares, vitaminas liposolubles y alcaloides) y en algunos organismos es parte de mecanismos de defensa contra patógenos y alcaloides tóxicos de las plantas (14,19,31).

Los fungicidas Triazoles alcanzan su máximo de acumulación dentro del micelio del hongo después de 15 o 20 minutos luego de entrar en contacto con el microorganismo (22). Los triazoles se unen al sitio de acción de la enzima en dos lugares: al átomo de Hierro del grupo Heme, a través del anillo Triazol; y al sitio de unión de la enzima con el sustrato, a través de los otros sustituyentes (27).

Al sitio activo de la enzima se accede por medio de un largo canal en su molécula. En la superficie de la enzima adyacente a la entrada del canal, existe un grupo de aminoácidos hidrófobos cuya función es reconocer al Lanosterol (27). Los Triazoles también pueden ser reconocidos por estos aminoácidos, y luego de ingresar al canal, los electrones π delocalizados del anillo triazol son atraídos por los orbitales de coordinación del Hierro del grupo heme, para finalmente enlazarse a este covalentemente a través del átomo N4 (31). Por otra parte, el grupo fenilo (usualmente en C2 o C3) se sitúa en la cavidad hidrófoba de la enzima (Figura 2.3) (27).

Adicionalmente, la presencia de grupos metil u oxígeno en la posición C2 o C3 (los carbonos adyacentes al anillo triazol) tienden a favorecer la actividad antifúngica, mientras que, cualquier radical en posición 2 o 6 dentro del anillo bencénico tiende a reducir la afinidad con la enzima y por tanto la actividad fungicida (27).

FIGURA 2.3
INTERACCIÓN ENTRE LA MOLÉCULA DEL TRIAZOL Y LA
ENZIMA ESTEROL-14-DEMETILASA. (CYP).



Tomada de: Sádaba et al. Relación entre Estructura y Función de los Azoles. 2004

La conformación espacial de la molécula del fungicida es también un factor que puede incrementar o reducir la actividad de la molécula; esto se debe a que, generalmente, el C2 o C3 son carbonos quirales; pudiendo de esta manera, un mismo compuesto, presentar dos o más estereoisómeros que difieren en la forma en la que se acoplan a la molécula de la enzima y consecuentemente exhiben distintos niveles de actividad sobre los hongos (27).

Al inhibirse la acción de la esterol-14-demetilasa durante la biosíntesis del Esterol, se producen esteroides no demetilados (14-metil-esteroides) al final de esta ruta metabólica en lugar de esterol (21,22,27). Los 14-metil-esteroides reemplazan al esterol en su ubicación en la membrana del hongo (27). Estos compuestos, rompen las uniones entre los fosfolípidos de la membrana y de esta forma modifican la permeabilidad y estabilidad de la misma (22,27); adicionalmente, modifican la actividad de otras enzimas presentes en la membrana de los hongos y, por estas causas, el hongo detiene su crecimiento, y al no poderse alimentar finalmente muere (21,22,27).

2.3. Desarrollo de Resistencia y Tolerancia a los Fungicidas Triazoles: Mecanismos de Resistencia.

Los mecanismos mediante los cuales los hongos han logrado expresar resistencia a los fungicidas Triazoles aún no están satisfactoriamente identificados (4,5). Numerosos estudios, desarrollados en los distintos campos de aplicación de este tipo de fungicidas, han revelado más de un mecanismo de resistencia; estos mecanismos exhiben una gran variabilidad según la especie del hongo y la molécula fungicida utilizada en el estudio (30).

De forma general hasta 1982, después de cerca de 10 años de uso comercial en agricultura, existían muy pocos reportes de resistencia a los fungicidas DMI's. El mayor número de estas cepas resistentes se habían originado en laboratorios a través de tratamientos mutagénicos; estas cepas, a pesar de haber expresado resistencia a los DMI's habían perdido patogenicidad y viabilidad, por lo que, se consideró que la expresión de mecanismos de resistencia a estos fungicidas era muy poco probable (4).

No obstante, durante la década de 1980 se manifestaron mecanismos de resistencia efectiva en varios patógenos, aunque de forma lenta y muy variable en severidad (4). El problema más claro de resistencia a estos fungicidas se manifestó en el control del Mildew Polvoriento de la cebada, del pepino y de la vid. Posteriormente, este problema también se manifestó de forma notable en la Sigatoka Negra del banano¹ y la Roña de la Manzana (4).

¹ En la sección 1.4 se aborda más detalladamente la evolución del problema de la resistencia a los Triazoles en *Mycosphaerella fijiensis*.

Como ya se mencionó, varios mecanismos han sido reportados como responsables de la expresión de resistencia en distintas especies de hongos (4,30). No obstante, se puede anotar que son tres los principales fenómenos asociados a la manifestación de este problema:

- 1. Reducción de la concentración intracelular de la molécula fungicida.-** Los mecanismos para alcanzar este efecto pueden ser muy variados. Estudios realizados en el área de la Micología Médica sobre *Candida albicans*. han planteado algunas hipótesis que podrían explicar el origen metabólico de la resistencia a los triazoles.

En primer lugar, se ha planteado que la causa de este fenómeno puede estar asociada a un incremento en la expresión de la proteína transportadora CDR1, la cual pertenece a una superfamilia de transportadores ATP-dependientes que operan sobre distintos tipos de drogas (30). Este transportador expulsa el ingrediente activo del fungicida fuera del hongo, reduciendo de esta forma la concentración y la actividad del mismo. Este mecanismo

es también planteado como posible responsable de algunos casos de resistencia a la terbinafina (Alilamina) y amorolfina (Morfolina) (30).

Otra hipótesis similar también ha sido reportada. Ésta supone la sobre-expresión de un gen llamado *BEN^r* (también llamado *CaMDR1*) que codifica al transportador *Ben^r*. Este transportador pertenece a otra superfamilia de transportadores metabólicos de drogas, y el incremento de su actividad produce el mismo efecto observado con *CDR1* (30).

Estas hipótesis se fundamentan en que en varios estudios se ha logrado correlacionar la reducción de la concentración intracelular de varios triazoles con el incremento de la concentración del ARNm correspondiente a genes codificadores de proteínas transportadoras; como ya se dijo, con esto se activa un sistema de bombeo de moléculas de fungicida hacia el exterior del hongo, reduciendo de esta forma la eficacia del fungicida (30).

2. Activación de vías metabólicas alternativas que satisfagan la deficiencia de ergosterol.- En otro estudio, también realizado con *Candida albicans*, se observó que cepas resistentes al Ketoconazol contenían altas concentraciones de fecosterol intracelular; estas altas concentraciones sugieren una reducción de la actividad de la enzima Δ -5,6-desaturasa (30).

En presencia de Ketoconazol, estas cepas acumulan 14- α -metilfecosterol, el cual podría llegar a reemplazar parcialmente los requerimientos de ergosterol necesarios para mantener la viabilidad del hongo (30), de forma que debido a la actividad del fungicida, no sólo la esterol-14-demetilasa es inhibida, sino que también lo es la Δ -5,6-desaturasa, con lo que se activa una vía alterna que permite que la estructura de la membrana del hongo no sea totalmente afectada por la falta de ergosterol y consecuentemente, el hongo mantenga su viabilidad fisiológica.

Este fenómeno ha sido también observado en *Saccharomyces cerevisiae*, en donde luego de haber

perturbado el gen codificador de la enzima estero1-14-demetilasa (CYP51), la levadura sólo fue viable cuando ocurrían defectos en la actividad de la Δ -5,6-desaturasa (30).

No obstante, este mecanismo aún no ha sido satisfactoriamente validado, puesto que la inactivación del gen codificador de la Δ -5,6-desaturasa debería producir un efecto similar al descrito inicialmente, pero tal efecto no ha sido observado experimentalmente (30).

3. Modificaciones estructurales o Incremento de la actividad del Citocromo P-450.- Finalmente, otros mecanismos que se plantean para explicar la expresión de resistencia a los fungicidas triazoles en los hongos es la amplificación de la actividad de los genes codificadores del Citocromo P-450 (*CYP*) y modificación estructural del Citocromo P-450 (30).

En lo que respecta a la amplificación de los genes *CYP*, se ha observado que no sólo este gen es el que se amplifica sino que probablemente, todo el cromosoma

que los contiene lo hace (30). El amplificarse el gen *CYP* que codifica a la esterol-14-demetilasa, esta enzima incrementa también su actividad, reduciendo la efectividad del fungicida. Paralelamente, se ha observado que cuando este gen se amplifica, la síntesis de ergosterol también aumenta, no sólo a partir del Lanosterol, sino también a través de otras vías a partir de mevalonato, escualeno y acetato, debido a la amplificación de otras enzimas (e.g. oxidoescualenociclase) (30).

Por otra parte, en estudios realizados en *Candida albicans* y *Ustilago maydis* se ha observado resistencia al Ketoconazol, Itraconazol y Fluconazol, en el primer organismo; mientras que en el segundo, se ha expresado resistencia al Triadimenol (30). En ambos casos, se ha planteado que la aparición de dicha resistencia se debe a modificaciones estructurales en la esterol-14-demetilasa que reducen la afinidad entre la enzima y los triazoles.

No obstante, en un experimento con *C. Albicans* se observó que luego de resembrar las cepas resistentes en

un medio libre de fungicidas, la afinidad entre el Citocromo y los Triazoles se restableció, indicando que la resistencia expresada a través de este mecanismo puede ser reversible (30).

En la siguiente tabla 3 se observa un resumen de los principales mecanismos de resistencia anteriormente señalados.

De los mecanismos anteriormente señalados, es importante notar que debido a su variabilidad y a que hasta ahora las cepas *resistentes* han sido consideradas como tales únicamente por una reducción significativa de su sensibilidad al triazol, el *patrón de resistencia* aplicable en el caso de esta clase de fungicidas es el *Patrón de Resistencia de Pasos Múltiples*, referido a una expresión Poligénica (4). En cualquier caso, es muy difícil determinar el aporte individual de cada gen al mecanismo de resistencia global, pero para el caso de los triazoles (como se puede notar en los párrafos anteriores) existe cierta evidencia que vincula un gen particular con un efecto adecuadamente identificable (4,30).

Por otra parte, también en el caso de los triazoles, es importante notar también que en ocasiones un gen asociado a un mecanismo de resistencia no siempre expresa un efecto aditivo a la expresión global, sino que en ocasiones este efecto puede ser sinergista, potenciando únicamente la expresión de otro mecanismo puntual (4).

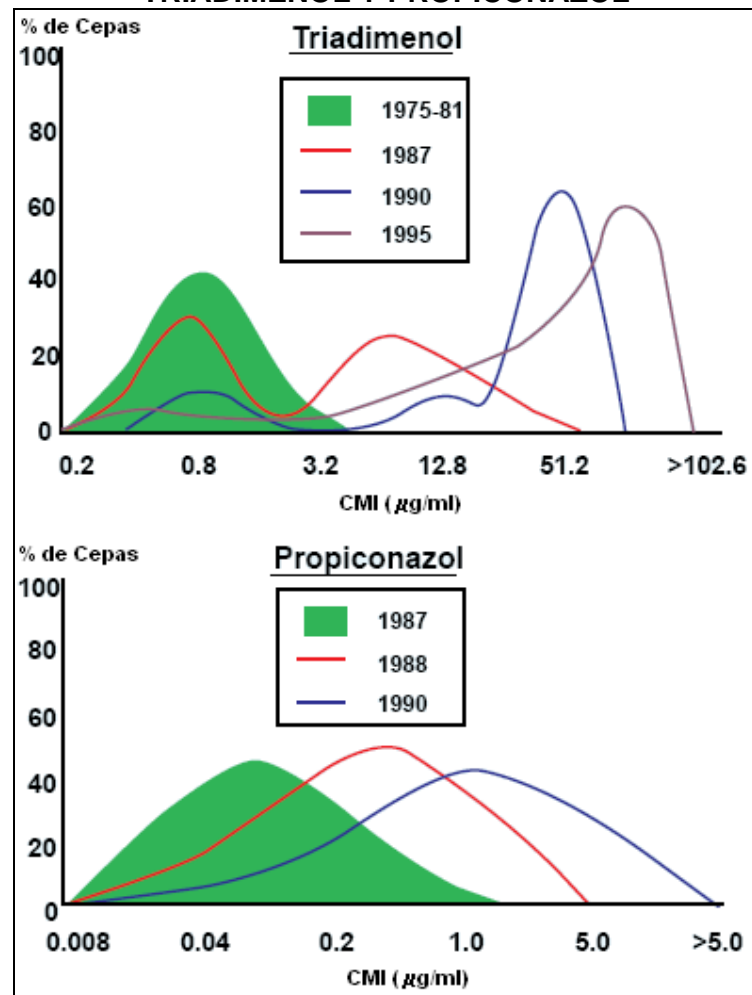
TABLA 3
POSIBLES MECANISMOS DE RESISTENCIA A FUNGICIDAS TRIAZOLES

Organismo	Fungicida	Posible Mecanismo(s) de Resistencia
<i>Candida albicans</i>	Ketoconazol	Reducción de la concentración intracelular del fungicida (CDR1, Ben ^r)
	Fluconazol	Vía metabólica alterna Δ -5,6-desaturasa (solo observado sobre Ketoconazol)
	Itraconazol	Modificación del sitio activo (esterol-14-demetilasa)
<i>Candida krusei</i>	Fluconazol	Reducción de la concentración intracelular del fungicida (CDR1, Ben ^r)
<i>Candida glabrata</i>	Fluconazol	Reducción de la concentración intracelular del fungicida (CDR1, Ben ^r)
	Ketoconazol	Amplificación del gen <i>CYP</i> , incremento de la actividad de esterol-14-demetilasa
	Itraconazol	Amplificación del gen <i>CYP</i> , incremento de la actividad de esterol-14-demetilasa
<i>Ustilago maydis</i>	Triadimenol	Modificación del sitio activo (esterol-14-demetilasa)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Fluconazol	Amplificación del gen <i>CYP</i> , incremento de la actividad de esterol-14-demetilasa
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fluconazol	Reducción de la concentración intracelular del fungicida.

Modificada. Vanden Bossche, H. Mechanisms of Antifungal Resistance. Revista Iberoamericana de Micología. No. 14. 1997

La variabilidad debida al carácter poligénico de la resistencia a los fungicida triazoles antes mencionada se puede notar en la Figura 2.4, dónde se observan dos patrones de resistencia distintos para dos fungicidas triazoles sobre el mismo hongo (*Rynchosporium secalis*) (5).

FIGURA 2.4
SENSIBILIDAD DE *Rynchosporium secalis* AL TRIADIMENOL Y PROPICONAZOL



Modificada. Brent, K, Hollomon, D. Fungicide Resistance: The Assesment of Risk. 1998.

Finalmente, otro aspecto determinante de los distintos mecanismos de resistencia a los Triazoles, es la manifestación de resistencia cruzada. La resistencia cruzada implica la posibilidad de que un organismo que haya expresado un mecanismo de resistencia a una determinada sustancia sea también resistente a otra gracias a este mismo mecanismo.

En este sentido, actualmente se conoce que los Triazoles, de forma general, exhiben todos resistencia cruzada en entre ellos (23). Por otra parte, también se han reportado casos en los que los triazoles exhiben resistencia cruzada negativa (el fenómeno inverso) con otros fungicidas, principalmente de la clase de las Morfolinas (30).

A pesar de lo antes mencionado, existe un reporte de una investigación médica desarrollada sobre *Hystoplasma capsulatum* en la que se observó resistencia cruzada negativa entre dos fungicidas triazoles, el Fluconazol y el Itraconazol, aunque los autores del reporte señalan que las causas de este fenómeno deben más ampliamente estudiadas (30).

Además de los distintos casos de resistencia cruzada, los triazoles pueden manifestar relaciones antagonistas o sinergistas con distintos compuestos no fungicidas (e.g. compuestos lipofílicos, detergentes, surfactantes, inhibidores de la respiración). Teniendo en cuenta esto, se puede confundir un caso de pérdida de sensibilidad hacia determinado triazol con una sencilla relación de antagonismo con algún compuesto presente en el entorno de aplicación.

Los efectos antagonistas que un compuesto puede causar en los triazoles pueden deberse a varias causas, dependiendo del antagonista, pero las más comunes son la formación de complejos antagonista-fungicida o la inducción de cambios en la membrana del hongo que disminuyan la tasa de absorción del fungicida (6). Los principales compuestos antagonistas de los triazoles son los compuestos lipofílicos, detergentes no iónicos, cloruros de Calcio o Magnesio, entre otros (6).

Por otra parte, los principales agentes sinergistas de los triazoles son el Cloruro de Hidrógeno, el Hidróxido de Sodio, los surfactantes catiónicos y aniónicos, y los inhibidores de la respiración celular (6). El efecto sinergista que estos

compuestos pueden expresar sobre los triazoles se debe a distintas causas, las cuales dependen del compuesto; no obstante, se pueden destacar tres principales causas: el incremento de la solubilidad del fungicida que mejora la absorción de este por parte del hongo, la modificación de las propiedades de la membrana que aumentan la afinidad para la absorción del fungicida, y finalmente la inhibición de los mecanismos de transporte activo que expulsan las moléculas fungicidas del interior del cuerpo del hongo (6).

CAPÍTULO 3

3. EL BUTÓXIDO DE PIPERONILO.

El butóxido de piperonilo (PBO; *Piperonyl butoxide*) es un conocido sinergista de los insecticidas y ha sido ampliamente utilizado en insecticidas de uso agrícola, veterinario y doméstico (29), e incluso existen referencias de otros usos como sinergista de ciertos grupos de herbicidas (15). Si embargo, la principal aplicación de este compuesto ha sido su mezcla con insecticidas piretroides, aplicación donde expresa su mayor potencial hasta el momento (7,17). No obstante, a pesar de su prolongada historia de uso y de su extensa aplicación en el control de plagas, lo que se conoce respecto a otras posibles aplicaciones prácticas del PBO es, comparativamente, muy poco.

3.1. Generalidades.

A finales de la década de 1930, el incremento del tráfico aéreo entre los Estados Unidos y países tropicales facilitó la aparición

problemas sanitarios en los Estados Unidos debido a las deficiencias de las medidas cuarentenarias de la época, principalmente en lo referente a la malaria y otras enfermedades transmitidas por insectos (29). Este hecho motivó a que los investigadores de la época movilizarán sus esfuerzos para encontrar una solución a estos problemas que ya amenazaban con volver convertirse en endémicos después de que se los había considerado como erradicados.

A comienzos de la década de 1940, el piretro (extraído a partir del Crisantemo, *Chrysanthemum cinerariaefolium*), era considerado como un insecticida estratégico para el control del mosquito y otros insectos vectores de enfermedades (29). El piretro era producido mayoritariamente en Japón y en África oriental que se encontraba en desarrollo, pero debido a la posibilidad de que las importaciones de piretro desde el Japón se vieran interrumpidas debido al ingreso de este país en la Segunda Guerra Mundial, fue necesario tomar medidas preventivas para evitar la potencial crisis sanitaria, puesto que las reservas de piretro locales y la producción de África oriental no eran capaces de abastecer la demanda de los programas de salud en marcha (29).

La medida tomada fue orientar las investigaciones hacia incrementar la eficiencia de los métodos de aplicación de insecticidas, descubrir nuevos compuestos que puedan sustituir al piretro como componente principal de los programas de control y desarrollar compuestos que permitan mejorar el desempeño del piretro, posteriormente a este tipo de compuestos con baja o ninguna acción intrínseca se los denominaría como sinergistas (29).

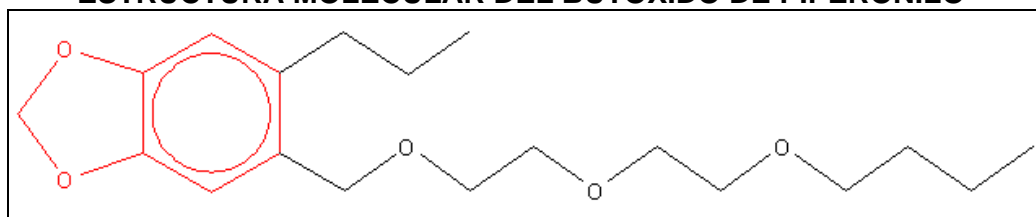
Entre 1938 y 1941, 75 patentes fueron asignadas, solo en los Estados Unidos, a 1400 compuestos naturales o sintéticos considerados como sustitutos, activadores o sinergistas del piretro. En 1940, C. Eagleson patentó el uso del aceite de sésamo (*Sesamum indicum*) como sinergista o “activador” de los insecticidas piretroides (29). Posteriormente, la Oficina de Entomología y Cuarentena del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos se interesó en el descubrimiento de Eagleson y fraccionó el aceite de sésamo en sus componentes moleculares; estos componentes fueron probados y hacia 1942 se determinó que dos de estos componentes presentaban efectos sinergistas cuando eran mezclados con el piretro. Uno

de estos componentes era la sesamina, la cual fue seleccionada para posteriores estudios debido a que sus características físico-químicas facilitarían su utilización comercial (29).

Finalmente, Herman Wachs en 1947, sintetizó el Butóxido de Piperonilo, compuesto relacionado con la sesamina, pero que poseía características que le permitían incrementar su eficiencia y que facilitaban su uso comercial (29). Actualmente, el PBO es sintetizado a partir del aceite de sazafrán, utilizando el mismo procedimiento descrito por Wachs en 1947 (2).

En la Figura 3.1 se muestra la estructura química del Butóxido de Piperonilo, y a continuación, en la tabla 4 se muestra un resumen de sus principales propiedades químicas.

FIGURA 3.1
ESTRUCTURA MOLECULAR DEL BUTÓXIDO DE PIPERONILO*



*En rojo se muestra el grupo Metiléndioxifenil (Safrol)

TABLA 4
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL PBO

Nombre IUPAC:	2-(2-butoxi)etil 6-propilpiperonil éter	
Fórmula empírica:	C ₁₉ H ₃₀ O ₅	
Masa Molecular:	338.43	
Densidad:	1.057 g·ml ⁻¹	A 25°C
Punto de Ebullición:	180 °C	A 1 mmHg
Presión de Vapor:	<1x10 ⁻⁷ mmHg	A 25 °C
Solubilidad en agua:	14.3 mg·l ⁻¹	A 25 °C
Solubilidad en solv. orgánicos:	Altamente soluble	
Coefficiente de partición Octanol : Agua	4.75	(log P _{ow})

Modificada. Di Blasi, G. 1998. A Review of the Chemistry of Piperonyl Butoxide. 1998.

Además, es importante notar que la estabilidad del PBO es muy alta respecto al tiempo y la temperatura (9). No obstante, cierta inestabilidad a la luz solar (especialmente a la radiación Ultravioleta) ha sido reportada (18).

Por otra parte, el comportamiento del PBO en el ambiente ha sido también objeto de extensos estudios. Estos estudios han estado orientados principalmente a determinar el destino del PBO y de sus productos de degradación en la naturaleza. Como resultado se ha determinado que el PBO se descompone rápidamente cuando es expuesto a la luz ultravioleta y la radiación solar cuando se encuentra en presencia de oxígeno, pero sus productos de descomposición son disipados hasta

niveles en los que no producen impacto al ambiente (2). No obstante, en ausencia de estas condiciones (lo cual habitualmente no ocurre en la naturaleza), el PBO es capaz de persistir en el tiempo; este hecho le confiere al PBO la propiedad de descomponerse en ambientes naturales, con la consecuencia de reducir su impacto ambiental, y permanecer activo bajo las condiciones en las que se necesita que permanezca de tal forma (e.g. almacenamiento de granos, tratamiento de maderas, horizontes profundos del suelo) (2).

En lo que respecta a la toxicología del PBO, numerosos estudios han sido desarrollados para determinar el nivel de seguridad de uso en sus distintas aplicaciones (8). El PBO ha demostrado ser prácticamente inocuo para el ser humano a concentraciones muy superiores a las que normalmente este puede estar expuesto (8). En el ser humano, la mayor parte del PBO es metabolizado a partir de cuatro sitios de ataque principales: el anillo metiléndioxi, el anillo fenílico, la cadena lateral propílica y la cadena lateral 2-(2-butoxi)etoximetílica y rápidamente excretado a través de la bilis, orina y heces; mientras que otra porción menor es acumulada en el tejido adiposo (8).

En animales de ensayo se han detectado algunos efectos tóxicos en estudios a corto y largo plazo. El principal órgano en el cual se acumula el PBO una vez absorbido es el hígado, donde se ha observado hipertrofia, hiperplasia, modificaciones en los hepatocitos; además, en algunos de los casos en los que se ha observado mortalidad, esta ha estado asociada a efectos tóxicos hepáticos severos (3).

En estudios teratogénicos y mutagénicos realizados con PBO no se han observado efectos adversos en la fecundidad, y gestación de los animales de ensayo (principalmente ratones, ratas y conejos), con excepción de los casos en que niveles de exposición exageradamente elevados fueron evaluados, en donde el único efecto observado fue la reducción del peso de las cría al nacimiento y destete (3). Tampoco se han observado efectos mutagénicos significativos (3).

Finalmente, uno de los aspectos más estudiados de la toxicología del PBO ha sido sus posibles efectos oncogénicos. A este respecto, numerosos estudios han señalado que cuando el PBO ha sido administrado a dosis elevadas y por tiempo

prolongado se pueden producir tumores hepáticos malignos. No obstante, no se ha reportado evidencia estadísticamente significativa de que la causa de este efecto este relacionada con la genotoxicidad del PBO (3).

En la Tabla 5 se puede observar un resumen de las dosis letales medias calculadas en varios animales de ensayo para determinar la toxicidad aguda del PBO.

TABLA 5
VALORES DE DL₅₀ PARA TOXICIDAD AGUDA DEL PBO

Especie	Vía	DL₅₀ ó CL₅₀ (g/Kg peso vivo)	Referencia
Ratón	Oral	4.0	Negherbon (1959)
Ratón	Oral	8.3	Draize <i>et al.</i> (1944)
Rata	Oral	1.57 (♂) 7.22 (♀)	Gabriel (1991a)
Rata	Oral	8.0-10.6	Sarles <i>et al.</i> (1949)
Rata	Oral	12.8	Lehman (1948)
Rata	Inhalación	>5.9*	Hoffman (1991)
Rata	Subcutánea	>15.9	Sarles <i>et al.</i> (1949)
Conejo	Oral	2.7-5.3	Sarles <i>et al.</i> (1949)
Conejo	Dermal	>2.0	Gabriel (1991b)
Gato	Oral	>10.6	Sarles <i>et al.</i> (1949)
Perro	Oral	>8.0	Sarles <i>et al.</i> (1949)

*[g·l⁻¹ de aire]

Tomada de Breathnach R. The Safety of Piperonyl Butoxide. 1998

3.2. Relación entre el Butóxido de Piperonilo y las enzimas Citocromo P-450.

Desde hace más de 35 años se han venido realizando investigaciones para esclarecer la relación existente entre el PBO y las enzimas Citocromo P-450; no obstante, hasta el momento no existe información concluyente respecto a los mecanismos a través de los cuales el PBO ejerce su efecto sobre el Citocromo (19).

Por otra parte, un hecho que ha sido bien documentado y aceptado es que el PBO puede actuar como sustrato, inductor e inhibidor de este tipo de enzimas (19); hecho que se conoce como *Respuesta Bifásica*. La Respuesta Bifásica no ha sido observada únicamente en el caso del PBO, sino también en muchos otros compuestos Metiléndioxifenil (MDP) y xenobióticos.

La Respuesta Bifásica en el PBO, se caracteriza por una rápida reducción del nivel de actividad del Citocromo, seguido por un lento aumento de la misma por encima del nivel inicial y finalmente una recuperación del nivel normal (19). Es importante anotar que la magnitud de la inhibición y del

estímulo no siempre son iguales; esta diferencia en los efectos en ocasiones se incrementa o disminuye dependiendo de la isozima P-450 evaluada, evidenciando cierta especificidad parcial (19).

A pesar de que especificidades como la mencionada en el párrafo anterior han sido reportadas, de forma general, se considera que el PBO presenta efectos muy similares en la mayoría de las isozimas P-450, lo cual también ha sido documentado ampliamente (19); de forma que, más que considerar especificidad, se debe considerar la preferencia del PBO por determinadas familias de isozimas P-450 (19).

Finalmente, a pesar de que el mecanismo de inhibición inducido por el Butóxido de Piperonilo sobre la actividad del Citocromo P-450 aún no está completamente dilucidado se ha logrado conocer ciertas características de este mecanismo. Primeramente, se sabe que el PBO actúa inicialmente como sustrato para el Citocromo, para luego desarrollar su acción inhibitoria; no obstante, la relación entre el butóxido de piperonilo y el Citocromo no se ajusta a una relación enzima-sustrato convencional (19).

Por otra parte, se sabe que debido a la actividad del Citocromo sobre el PBO, se produce un metabolito intermediario con propiedades inhibitorias muy estable, que es realmente el responsable de la reducción de la actividad del Citocromo (19).

Finalmente, en 1979 Dahl & Hodgson plantearon una hipótesis para explicar el mecanismo de la inhibición *in vivo* del PBO sobre el Citocromo, pero dicha hipótesis aún está en espera de validada debido a que no se ha podido detectar la formación de una especie química sumamente efímera, la cual representa uno de los fundamentos teóricos de la hipótesis. Esta hipótesis será más ampliamente referida en la sección 3.3.

3.3. Mecanismo de acción y Aplicaciones.

Sin duda que la principal aplicación del PBO ha sido el aprovechamiento de su efecto sinérgico de la acción de los insecticidas, especialmente los piretroides (7,17). Debido a esto, la mayor cantidad de información relacionada con el PBO se encuentra referida al campo del control de plagas; por lo que la descripción de su mecanismo de acción será abordada en este sentido.

Primeramente, es necesario definir que el PBO no posee una acción insecticida *per se*, sino que produce un efecto que reduce la capacidad de respuesta del insecto ante la acción del insecticida; es decir, el PBO no posee un efecto aditivo sobre la acción de los insecticidas, sino que posee un efecto sinergista sobre estos (28).

El beneficio obtenido de adicionar PBO a formulaciones insecticidas es la inhibición de los sistemas de detoxificación del insecticida; de forma que, el insecto pierde su capacidad de reaccionar ante el compuesto tóxico, aumentando su susceptibilidad a este, incluso a concentraciones menores a las utilizadas convencionalmente (28). Este punto ha sido de particular interés en el manejo de plagas que exhiben incrementos en sus niveles de tolerancia; puesto que es posible frenar la selección direccional de este tipo de poblaciones al inhibir los mecanismos que permiten la supervivencia de los individuos resistentes (10).

Como ya se mencionó, el mecanismo mediante el cual el PBO ejerce su acción no está concluyentemente dilucidado; no

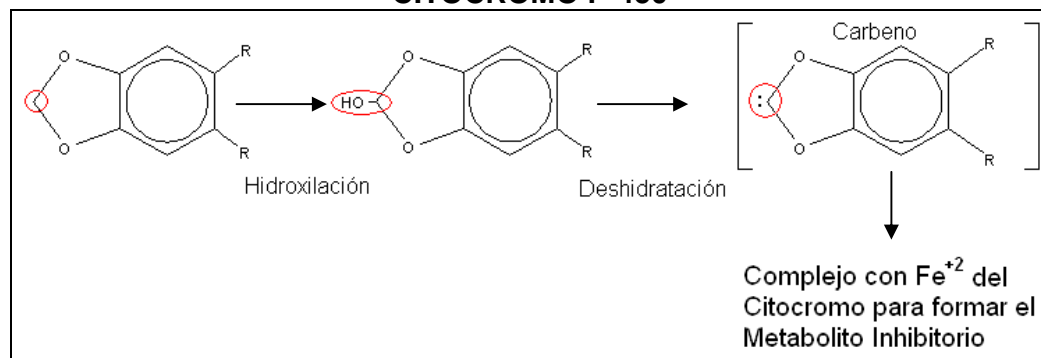
obstante, la hipótesis mencionada en la sección 3.2 permite explicar muchos de los resultados experimentales hasta ahora obtenidos.

Según esta hipótesis, inicialmente el PBO entra en contacto con la enzima Citocromo P-450 responsable de la detoxificación del compuesto tóxico y actúa como sustrato de esta; posteriormente, debido a la acción de la enzima, el grupo Metilén del PBO del anillo Metiléndioxifenil es hidroxilado y posteriormente deshidratado; producto de la deshidratación se forma un carbeno, que es una especie química sumamente inestable con un período de vida muy corto, pero altamente reactivo; finalmente, este carbeno forma un complejo con el Hierro del grupo heme de la enzima; este complejo formado (que además es muy estable) es quién impide que la enzima pueda continuar ejerciendo su acción detoxificadora sobre las moléculas del insecticida, de forma que este puede actuar libremente en el metabolismo del insecto (Figura 3.2)(19).

De forma que, en resumen, la función del PBO en las formulaciones insecticidas es eliminar los posibles *obstáculos metabólicos* que pueda presentar el insecto en su defensa para

permitir la expresión de una mayor toxicidad aguda por parte del insecticida. No obstante, cabe mencionar que el PBO además de estar involucrado directamente en la formación del Metabolito intermediario inhibitorio, participa también en al menos otros 28 procesos metabólicos adicionales en los que el Citocromo también participa, y que probablemente pueden aportar algún efecto en la inhibición global del Citocromo (19).

FIGURA 3.2
MECANISMO DE INHIBICIÓN HIPOTÉTICO DEL PBO SOBRE EL
CITOCROMO P-450



Probable Mecanismo de Formación del Complejo Metabolito Inhibitorio durante la Oxidación del PBO por el Citocromo P-450 según Dahl & Hodgson

A pesar de que el mayor efecto sinergista del PBO se observa cuando es combinado con insecticidas piretroides, también existen efectos sinergistas cuando se combina con Carbamatos y Organo-Fosforados, aunque en menor medida (28). Otro factor que determina el nivel de sinergismo logrado debido a la adición de PBO a formulaciones insecticidas es la proporción en

la que el PBO y el insecticida se mezclan (28); en este último aspecto, además de las consideraciones referentes a la eficiencia técnica, también participan consideraciones económicas para determinar la mejor estrategia de control a aplicar (28).

Finalmente, en lo que respecta a las aplicaciones prácticas del PBO, además de su extensivo uso en el control de plagas agrícolas, también ha sido utilizado ampliamente en el control de parásitos de animales de cría y humanos, así como también en los programas de control de vectores de enfermedades transmitidas por insectos en zonas urbanas. Algunas aplicaciones no tan difundidas (algunas aún están siendo evaluadas) del PBO son: potenciador de la acción de herbicidas, herramienta para la detección de pesticidas contaminantes en el agua y animales, potenciador de la actividad de los Benzimidazoles antihelmínticos y herramienta en el manejo e investigación de poblaciones de plagas resistentes.

CAPÍTULO 4

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

En base a la literatura revisada se plantearon dos hipótesis respecto al efecto que el Butóxido de Piperonilo podría expresar sobre el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*. Dichas hipótesis fueron:

1. *“El Butóxido de Piperonilo tiene un efecto inhibitor en el crecimiento de Mycosphaerella fijiensis”.*
2. *“El Butóxido de Piperonilo modifica el efecto de los fungicidas triazoles sobre el crecimiento de Mycosphaerella fijiensis”.*

En base a estas dos hipótesis se ejecutaron experimentos orientados a validarlas. El objetivo general del trabajo fue:

Determinar y Evaluar el efecto del Butóxido de Piperonilo y sus mezclas con fungicidas triazoles sobre el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis* a partir de sus esporas sexuales y asexuales bajo condiciones de laboratorio.

Los objetivos específicos planteados para satisfacer el objetivo general fueron.

- Establecer curvas de sensibilidad para cada producto evaluado en solitario, en los dos estadios reproductivos del hongo.
- Establecer curvas de respuesta para cada proporción de mezcla PBO:Triazol evaluada en los dos estadios reproductivos del hongo.
- Determinar si el Butóxido de Piperonilo posee acción inhibitoria *per se* sobre el crecimiento micelial.
- Determinar si el Butóxido de Piperonilo modifica el efecto de los fungicidas triazoles sobre el hongo.
- Determinar la variación, si existiere, del efecto inhibitor de los fungicidas triazoles cuando se prueban en mezcla con el PBO.
- Establecer la mejor proporción de mezcla del butóxido de piperonilo respecto a cada fungicida utilizado.

- Calcular los valores de CI_{50} y ecuaciones de regresión para todos los tratamientos evaluados.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), perteneciente a la Escuela Superior Politécnica del Litoral y ubicado en el Campus Gustavo Galindo en Guayaquil.

4.1. Metodología.-

Todas las metodologías utilizadas se ajustan a protocolos estandarizados utilizados por el CIBE.

4.1.1. Material biológico.- El material biológico utilizado para la realización de los experimentos fueron conidias y ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis* provenientes de plantaciones sin historial de aplicación de fungicidas. Los dos sitios de recolección fueron el sector de Balao en la provincia del Guayas y Valencia en la provincia de Los Ríos.

Las muestras se colectaron a partir de plantas enfermas escogidas al azar; cada muestra comprendía una o dos

hojas que expresaban los síntomas y el signo de la enfermedad. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en fundas de papel Kraft.

En el laboratorio, utilizando un estéreomicroscopio se realizó una selección de las zonas de las hojas que presentaban el mayor número de peritecios (cuerpo fructífero que contiene a las ascosporas o esporas sexuales de *M. fijiensis*) por campo. Estos sectores fueron cortados en cuadrados de aproximadamente 2cm de lado. Una vez que todas las muestras fueron revisadas y seleccionadas, todos los cuadrados obtenidos fueron mezclados aleatoriamente y engrapados en discos de papel filtro de aproximadamente 9cm de diámetro, con el haz de la hoja orientado hacia el papel. Los discos fueron colocados en cámara húmeda a 26°C durante 48 horas.

Posteriormente, los discos son retirados de la cámara húmeda y colocados en tapas de cajas Petri. Las tapas se colocan sobre las bases de las cajas que contienen medio de cultivo Agar-Agua (AA), de forma tal que el

medio queda expuesto al envés de las hojas engrapadas y se mantienen en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas para que se produzca la descarga de las ascosporas sobre el medio de cultivo, finalmente se retiran los discos. En este punto, se ha obtenido el material biológico necesario para desarrollar los ensayos con las esporas sexuales del hongo.

Para obtener el material biológico necesario para los ensayos con las esporas asexuales del hongo (conidias), es necesario incubar las cajas que contienen las ascosporas descargadas según lo indicado en el párrafo anterior por 48 horas a 26°C. Posteriormente, es necesario transferir cada ascospora a medio de cultivo Mycophil Agar; para ello, se utiliza un estéreomicroscopio y un asa de platino muy fina, que permita “pescar” una sola ascospora por vez.

Las ascosporas son incubadas en Mycophil Agar por 7 días a 26°C, para luego transferir las colonias así formadas a medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). En PDA permanecerán en incubación por 21 días más. A

continuación, las colonias incubadas en PDA son colectadas, picadas y finalmente suspendidas en una solución de agua y TWEEN 20 al 0.005%. La suspensión, es agitada en un vórtex y dispensada ($\cong 100\mu\text{l}/\text{caja}$) en cajas Petri que contienen medio de cultivo Jugo de Vegetales V8 Agar (Agar V8). En este medio, las cajas son incubadas por siete días más, a 26°C y bajo un régimen de 24 horas de luz blanca.

Finalmente, las colonias obtenidas son colectadas en otra solución de TWEEN20 al 0.005% y agitadas en un vórtex. Esta suspensión contiene las conidias o esporas asexuales del hongo, que son el material de siembra para los ensayos en esta fase de los experimentos.

4.1.2. Reactivos de ensayo.- Se utilizaron formulaciones comerciales de fungicidas triazoles para la ejecución de los experimentos. Los ingredientes activos utilizados fueron: Fenbuconazol (INDAR ®), Propiconazol (Strike ®) y Bitertanol (Baycor ®).

El Butóxido de Piperonilo utilizado fue un concentrado emulsionable de grado técnico elaborado por ENDURA (Italia), bajo el nombre de PB-80 EC-NF. El emulsificante de esta formulación es una mezcla de Dialquilsulfosuccinato de Sodio y Alcoxilato polimérico.

4.1.3. Medios de cultivo envenenados.- Para evaluar el crecimiento del hongo en sus dos estadios de reproducción se utilizó la técnica del medio de cultivo envenenado. Para ello, se prepararon diluciones de los productos a probar calculadas para que produzcan la concentración deseada en el medio. Estas diluciones fueron añadidas al medio de cultivo fundente ($\cong 60^{\circ}\text{C}$) y homogenizadas, para posteriormente ser distribuidas en las cajas Petri. El volumen de medio envenenado dispensado en cada caja fue de 10ml aproximadamente. El medio utilizado para la evaluación de la fase sexual fue Agar Agua, mientras que para la fase asexual fue Papa Dextrosa Agar.

4.1.4. Siembra e Incubación.- Dos técnicas de siembras fueron utilizadas de acuerdo al estadio reproductivo

evaluado. Para la fase sexual, se utilizó la descarga directa de ascosporas desde el material enfermo sobre el medio de cultivo envenenado según se describió en la sección 4.1.1. Para la fase asexual, se dispensaron 100 μ l de la suspensión de conidias preparada según lo descrito en la sección 4.1.1, esta suspensión fue distribuida sobre la superficie del medio de cultivo de forma homogénea.

El período de incubación para los ensayos con ascosporas fue de 48 horas bajo condiciones de oscuridad a 26°C; mientras que, para conidias fue de 5 días a 26°C bajo un régimen de 24h de luz blanca.

4.1.5. Medición.- Todas las mediciones se realizaron una vez concluido el período de incubación descrito en la sección anterior.

Para la medición de la variable *longitud del tubo germinativo* de las ascosporas se utilizó un microscopio invertido y un micrómetro ocular. El objetivo en el cual se realizaron las mediciones fue de 32x. Se midió el tubo

germinativo más largo de 50 ascosporas por tratamiento a partir de cinco cajas Petri distintas que contenían el tratamiento evaluado.

Para los tratamientos de la fase asexual, se midió la variable *radio de la colonia* utilizando el mismo tipo de microscopio, micrómetro y objetivo mencionado anteriormente. Se realizó la medición de la variable en 50 colonias de cada tratamiento provenientes de cinco cajas Petri que contenían el tratamiento evaluado.

4.2. Procesamiento de Datos.-

Los datos obtenidos de las mediciones fueron procesados para transformar las unidades arbitrarias observadas en micrómetros (μm), esto se hizo multiplicando por el factor de conversión 6,9 , correspondiente a un objetivo de 32x, obtenido según la tabla de calibración del Laboratorio de Fitopatología del CIBE.

Las longitudes en micrómetros fueron utilizadas para obtener los porcentajes de inhibición ($\%_{\text{inhibición}}$) para cada observación en cada tratamiento. Para esto se comparó la longitud promedio de los tratamientos controles con cada una de las

observaciones (cincuenta) de cada tratamiento, según la siguiente fórmula.

$$\%_{\text{inhibición}} = \left(1 - \frac{l_{\text{observada}}}{\bar{l}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Siendo:

l = Longitud observada en cada unidad experimental [μm]

\bar{l} = Longitud media del tratamiento control [μm]

4.3. Análisis Estadístico.-

Los análisis estadísticos descritos a continuación se realizaron bajo los mismos criterios y supuestos en los ensayos con los dos estadíos reproductivos del hongo.

4.3.1. Descripción General de los Ensayos.- Se desarrollaron dos ensayos orientados a validar las dos hipótesis anteriormente planteadas.

En primer lugar para determinar si el Butóxido de Piperonilo posee un efecto inhibitor *per se* sobre el crecimiento de *M. fijiensis* se desarrolló un ensayo dónde se evaluó el efecto de distintas concentraciones de PBO

en el medio de cultivo de *M. fijiensis*. Este efecto fue comparado con el efecto de tres fungicidas triazoles (testigos convencionales); además un testigo absoluto fue utilizado para calcular el porcentaje de inhibición. El factor evaluado fue "Ingrediente Activo" en cuatro niveles y un testigo absoluto. Este factor se evaluó individualmente en cuatro concentraciones distintas en los niveles correspondientes a los fungicidas triazoles, y en siete concentraciones en el nivel correspondiente al PBO (Tabla 6).

TABLA 6
DESCRIPCIÓN DE LOS NIVELES DEL FACTOR
INGREDIENTE ACTIVO

Niveles del Factor Ingrediente Activo	Concentraciones
i1 : Fenbuconazol	[0.01],[0.1],[1.0], [5.0]
i2 : Propiconazol	[0.01],[0.1],[1.0], [5.0]
i3 : Bitertanol	[0.01],[0.1],[1.0], [5.0]
i4 : PBO	[0.01],[0.1],[1.0], [5.0], [10.0], [100.0], [1000.0*]
Testigo Absoluto	

*No fue posible evaluar esta concentración en los tratamientos con conidias.

La variable evaluada en este ensayo fue el porcentaje de inhibición calculado según se describió anteriormente. La

unidad experimental estuvo compuesta por una ascospora germinada o colonia, según el estadio evaluado. Se evaluaron 50 unidades experimentales por cada tratamiento.

Por otra parte, para determinar si el PBO modificaba el efecto de los fungicidas Triazoles sobre *M. fijiensis* al ser mezclado con estos, se montó un ensayo en el cual una sola concentración de cada Triazol (0.1ppm) fue mezclada en distintas proporciones con PBO. El efecto global fue evaluado y comparado con un testigo fungicida (el efecto del fungicida a la concentración usada) y nuevamente, un testigo absoluto fue utilizado para calcular el porcentaje de inhibición.

Los factores a evaluar en este ensayo fueron “Ingrediente Activo”, en los mismos niveles descritos anteriormente, y “Proporción de Mezcla” en cuatro niveles, con tres testigos fungicidas y un testigo absoluto (Tabla 7).

TABLA 7
DESCRIPCIÓN DE LOS NIVELES DEL FACTOR
PROPORCIÓN DE MEZCLA*

Nivel
p1 : 10 : 1
p2 : 20 : 1
p3 : 30 : 1
p4 : 40 : 1
Testigo Fenbuconazol [0.1]
Testigo Propiconazol [0.1]
Testigo Bitertanol [0.1]
Testigo Absoluto

*Las proporciones se expresan como Partes de PBO : Partes de Triazol.

La variable evaluada en este ensayo fue el porcentaje de inhibición, calculado como se señaló en la sección 4.2. En este caso, la unidad experimental también estuvo compuesta por una ascospora germinada o colonia, según el estadio evaluado, y así mismo, se evaluaron 50 unidades experimentales por cada tratamiento.

4.3.2. Análisis de Varianza.- Con los datos obtenidos se ejecutaron Análisis de Varianza para identificar diferencias entre tratamientos. En todos los tratamientos, los testigos absolutos no fueron utilizados directamente para los Análisis de Varianza,

sino que sólo se usaron para calcular el porcentaje de inhibición en cada observación de cada tratamiento. Para eliminar los términos negativos se sumó el valor de 100 (cien) a cada una de las observaciones. El Diseño Completamente Aleatorizado fue utilizado en todos los Análisis realizados.

En el primer ensayo se realizaron Análisis de Varianza para buscar diferencias entre los efectos del PBO y de los Triazoles en cada nivel de concentración, de manera individual, según el esquema a continuación.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos	3
Error Experimental	196
Total	199

Adicionalmente, se realizó otro análisis de varianza para buscar diferencias entre los efectos de las distintas concentraciones de PBO, según el esquema siguiente.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos	6
Error Experimental	343
Total	349

Para el segundo ensayo se realizó un Análisis de Varianza en arreglo factorial con todos los niveles de los dos factores evaluados, de acuerdo con el siguiente esquema.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos*	11
I	2
P	3
I x P	6
Error Experimental	588
Total	599

* Factor I: Ingrediente Activo
* Factor P: Proporción de Mezcla

Finalmente, se realizó un Análisis de Varianza individual para cada Fungicida para buscar diferencias entre los efectos de las distintas proporciones de mezcla de PBO : Triazol, y el efecto del tratamiento

control del fungicida a la concentración base (0.1ppm), según el siguiente esquema.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Tratamientos	4
Error Experimental	245
Total	249

4.3.3. Pruebas de Significación.- En todos los Análisis de Varianza realizados, las medias de los tratamientos obtenidas fueron sometidas a la prueba de significación de Tukey, al 5% de probabilidad para identificar rangos de significancia.

4.4. Curvas de Sensibilidad.-

Adicionalmente a los Análisis Estadísticos, se construyó la curva de sensibilidad para cada Ingrediente Activo evaluado, en el primer ensayo con Ascosporas.

Para la construcción de la curva de sensibilidad se utilizaron ecuaciones de regresión logarítmicas para modelar el comportamiento del ingrediente activo en las distintas

concentraciones. Además se calculó la concentración inhibitoria media (CI_{50}) para cada tratamiento.

En los tratamientos con conidias no se realizó este proceso debido a la falta de representatividad de los datos que se pudieran obtener; en estos casos únicamente se construyó una curva de respuesta.

Por otra parte, para el segundo ensayo se construyó una curva de respuesta en base a los porcentajes de inhibición de los tratamientos de dicho ensayo, y se los comparo con la curva testigo del fungicida a la concentración evaluada.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS.

5.1 Efecto del PBO sobre ascosporas de *M. fijiensis*.-

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los efectos de los fungicidas triazoles y el efecto del PBO en todas las concentraciones evaluadas. Los Coeficientes de Variación para estos análisis se mantuvieron en niveles entre 7% y 11%.

En la prueba de significación de Tukey se observaron desde dos hasta cuatro niveles de significancia, pero en todos los casos el PBO fue diferente a todos los demás tratamientos presentando la menor de las medias (Tabla 8).

TABLA 8.
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO DE
ASCOSPORAS DE *M. fijiensis*

Ingrediente Activo	Concentración [ppm]			
	0.01	0.1	1.0	5.0
Propiconazol	54.5a	58.8b	67.7b	75.3a
Bitertanol	46.6b	65.9a	74.2a	79.4a
Fenbuconazol	46.1b	52.3c	62.7b	75.9a
BOP	-2.0c	11.4d	8.7c	10.8b
\bar{s}_d	2.06	1.61	1.58	1.58

Medias que comparten las mismas letras dentro de la misma columna no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$.

Por otra parte, también se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los efectos de las distintas concentraciones de PBO. Se observaron tres niveles de significancia en este análisis (Tabla 9). El Coeficiente de Variación fue del 15.97%.

Finalmente, en lo que respecta a la curva sensibilidad, se determinaron las concentraciones medias inhibitorias (CI_{50}) para todos los fungicidas; no obstante, no fue posible determinar una CI_{50} válida para el PBO a ninguna de las concentraciones evaluadas. Extrapolando la ecuación de regresión asociada a los datos experimentales obtenidos, se obtiene un valor máximo de inhibición de 43.7% a una concentración del 100% de PBO.

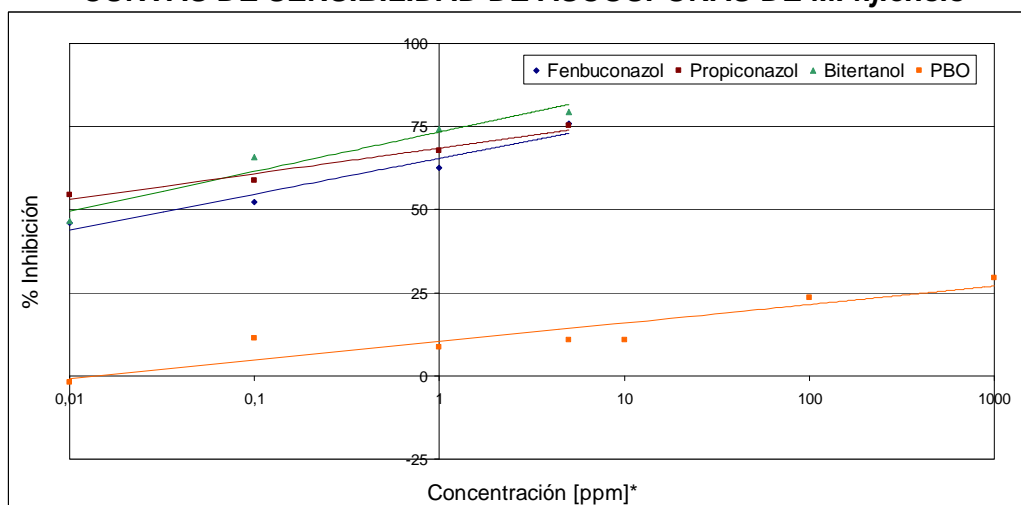
Las Curvas de Sensibilidad, las CI_{50} y las ecuaciones de regresión obtenidas se observan en la Figura 5.1 y en la Tabla 10.

TABLA 9
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO DE
ASCOSPORAS DE *M. fijiensis*

Tratamiento	\bar{x}	(%inhibición)
[1000.0ppm]	29.5	a
[100.0ppm]	23.6	a
[0.1ppm]	11.4	b
[10.0ppm]	10.9	b
[5.0ppm]	10.8	b
[1.0ppm]	8.7	b c
[0.01ppm]	-2.0	c

Medias que comparten las mismas letras no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$ ($S\bar{d} = 2.550$)

FIGURA 5.1
CURVAS DE SENSIBILIDAD DE ASCOSPORAS DE *M. fijiensis*



*Eje x en escala logarítmica.

TABLA 10
DESCRIPTORES DE LAS CURVAS DE SENSIBILIDAD DE
ASCOSPORAS DE *M. fijiensis*

Ingrediente Activo	CI ₅₀ [ppm]	Ecuación de Regresión	R ²
Fenbuconazol	0.037	$y = 4,6721\text{Ln}(x) + 65,432$	0.95
Propiconazol	0.004	$y = 3,3538\text{Ln}(x) + 68,523$	0.97
Bitertanol	0.011	$y = 5,1618\text{Ln}(x) + 73,372$	0.95
PBO	-X-	$y = 2,4171\text{Ln}(x) + 10,324$	0.85

5.2 Efecto del PBO sobre conidias de *M. fijiensis*.-

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los efectos de los fungicidas triazoles y el efecto del PBO en todas las concentraciones evaluadas. Los Coeficientes de Variación para estos análisis se mantuvieron en niveles entre 8% y 13%.

En la prueba de significación de Tukey se observaron desde dos hasta cuatro niveles de significancia. En los resultados de estas pruebas se puede notar que el PBO mostró un efecto mayor en las dos concentraciones más bajas, mientras que a las concentraciones más altas su efecto fue el menor entre los cuatro ingredientes activos. Es importante notar que en las concentraciones de [1ppm] y [5ppm] se observó un efecto estimulante del crecimiento de las colonias al expresarse

valores negativos del porcentaje de inhibición. La tendencia del porcentaje de inhibición promedio asociada a los tratamientos con PBO respecto a la concentración fue decreciente (Tabla 11).

TABLA 11
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DE COLONIAS CULTIVADAS A PARTIR
DE CONIDIAS DE *M. fijiensis*

Ingrediente Activo	Concentración [ppm]			
	0.01	0.1	1.0	5.0
Propiconazol	7.39b	18.07c	56.62b	88.29a
Bitertanol	8.29b	8.61d	78.28a	87.43a
Fenbuconazol	11.45b	25.27b	26.84c	38.90b
BOP	47.27a	37.56a	-47.07d	-43.99c
\bar{s}_d	2.14	2.10	2.12	1.76

Medias que comparten las mismas letras dentro de la misma columna no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$.

Por otra parte, también se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los efectos de las distintas concentraciones de PBO. Se observaron dos niveles de significancia en este análisis (Tabla 12). El Coeficiente de Variación fue del 20.71%.

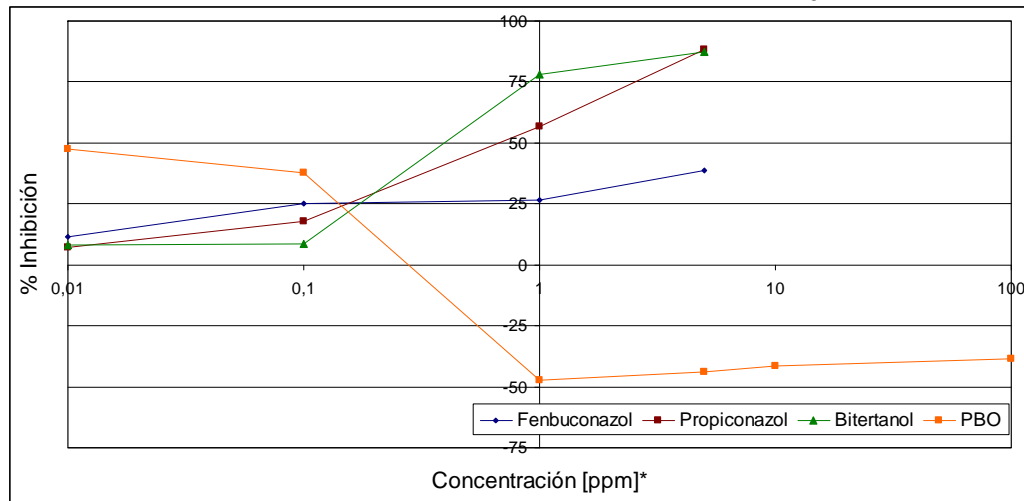
TABLA 12
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DE COLONIAS CULTIVADAS A PARTIR DE
CONIDIAS DE *M. fijiensis*

Tratamiento	\bar{x} (% _{inhibición})	
[0.01ppm]	47.27	a
[0.1ppm]	37.56	a
[100.0ppm]	-38.72	b
[10.0ppm]	-41.64	b
[5.0ppm]	-43.99	b
[1.0ppm]	-47.07	b

Medias que comparten las mismas letras no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$ ($S\bar{d} = 2.501$)

Finalmente, en lo que respecta a la curva de respuesta, se observó un mejor efecto a bajas concentraciones por parte del PBO respecto a los triazoles, pero a medida que la concentración de ingrediente activo aumenta, los triazoles expresan una tendencia creciente en el porcentaje de inhibición, mientras que el PBO expresa una tendencia decreciente e incluso estimulante para el desarrollo del hongo (Figura 5.2).

FIGURA 5.2
CURVA DE RESPUESTA DE CONIDIAS DE *M. fijiensis*



* Eje x en escala logarítmica

5.3 Efecto de Las mezclas PBO : Triazoles sobre ascosporas de *M. fijiensis*.-

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para los niveles de los dos factores evaluados y para la interacción de ambos factores. El Coeficiente de Variación fue de 9.76%.

Los resultados de la prueba de Tukey al 5% de probabilidad mostraron la presencia de seis niveles de significancia entre los tratamientos (Tabla 13).

TABLA 13
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO DE
ASCOSPORAS DE *M. fijiensis*

Tratamiento		\bar{x} (% _{inhibición})			
Ingrediente Activo	Proporción PBO:Triazol*				
Bitertanol	40:1	72.04	a		
Bitertanol	30:1	70.85	a		
Bitertanol	20:1	63.58	a		
Bitertanol	10:1	49.39	b		
Propiconazol	20:1	47.74	b		
Propiconazol	30:1	46.03	b	c	
Propiconazol	40:1	42.15	b	c	d
Propiconazol	10:1	37.27	c	d	e
Fenbuconazol	30:1	36.56		d	e
Fenbuconazol	40:1	33.42		d	e
Fenbuconazol	20:1	32.87			e
Fenbuconazol	10:1	22.27			f

*En función de una concentración base de Triazol equivalente a [0.1ppm]

Medias que comparten las mismas letras no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$ ($S\bar{d} = 2.018$)

Por otra parte, en el Análisis de Varianza del factor proporción de mezcla realizado para cada uno de los Ingredientes activos individualmente donde adicionalmente se realizó la comparación con el tratamiento testigo, se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los niveles

incluido el tratamiento testigo. Los Coeficientes de Variación estuvieron en niveles entre el 5% y el 12%.

En las pruebas de Tukey realizadas en estos análisis se distinguieron entre tres y cuatro niveles de significancia. En las pruebas desarrolladas con Fenbuconazol y Propiconazol, los tratamientos mezclados mostraron un porcentaje de inhibición menor que el testigo fungicida, mientras que en las pruebas con Bitertanol, al menos un tratamiento mezclado fue estadísticamente superior al control (Tablas 14).

TABLA 14
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO DE
ASCOSPORAS DE *M. fijiensis*

	Ingrediente Activo		
	Propiconazol	Bitertanol	Fenbuconazol
Testigo	58.81a	65.90bc	52.30a
10:1	37.27c	49.39d	22.27c
20:1	47.74b	63.56c	32.87b
30:1	46.03b	70.85ab	36.56b
40:1	42.15bc	72.04a	33.42b
\bar{s}_d	1.33	1.91	2.33

Medias que comparten las mismas letras dentro de la misma columna no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$.

Las curvas de respuesta de estos tratamientos se encuentran graficadas en el Anexo 2.

5.4 Efecto de Las mezclas PBO : Triazoles sobre conidias de *M. fijiensis*.-

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para los niveles de los dos factores evaluados y para la interacción de ambos factores. El Coeficiente de Variación fue de 14.97%. Los resultados de la prueba de Tukey al 5% de probabilidad mostraron la presencia de cuatro niveles de significancia entre los tratamientos (Tabla 15).

TABLA 15
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DE COLONIAS CULTIVADAS A PARTIR DE
CONIDIAS DE *M. fijiensis*

Tratamiento		\bar{x} (% _{inhibición})	
Ingrediente Activo	Proporción PBO:Triazol		
Propiconazol	30:1	38.56	a
Bitertanol	20:1	36.80	a
Bitertanol	10:1	35.24	a
Fenbuconazol	40:1	34.98	a b
Fenbuconazol	30:1	34.88	a b
Bitertanol	30:1	34.71	a b
Bitertanol	40:1	32.23	a b c
Fenbuconazol	20:1	22.92	b c d
Propiconazol	10:1	22.36	b c d
Propiconazol	20:1	20.24	c d
Propiconazol	40:1	19.44	d
Fenbuconazol	10:1	18.09	d

Medias que comparten las mismas letras no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$ ($S\bar{d} = 2.735$)

Por otra parte, en el Análisis de Varianza del factor proporción de mezcla realizado para cada uno de los Ingredientes activos individualmente donde adicionalmente se realizó la comparación con el tratamiento testigo, se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los niveles incluido el tratamiento testigo. Los Coeficientes de Variación estuvieron en niveles entre el 13% y el 16%.

En las pruebas de Tukey realizadas en estos análisis se distinguieron dos niveles de significancia. En este caso, en todos los ingredientes activos, por lo menos dos niveles de proporción superaron el efecto del testigo fungicida (Tabla 16).

TABLA 16
PORCENTAJES DE INHIBICIÓN PROMEDIO DEL
CRECIMIENTO DE COLONIAS CULTIVADAS A PARTIR DE
CONIDIAS DE *M. fijiensis*

	Ingrediente Activo		
	Propiconazol	Bitertanol	Fenbuconazol
Testigo	18.07b	8.61b	25.27ab
10:1	22.36b	35.24a	18.09b
20:1	20.24b	36.80a	22.92b
30:1	38.56a	34.71a	34.88a
40:1	19.44b	32.23a	34.98a
\bar{s}_d	2.89	2.41	2.46

Medias que comparten las mismas letras dentro de la misma columna no difieren entre sí según la Prueba de Tukey a $p = 0.05$.

Las curvas de respuesta de estos tratamientos se encuentran graficadas en el Anexo 2.

5.5 Discusión.-

Como se puede observar en los resultados, en ningún tratamiento evaluado se ha podido notar que el PBO posea un efecto fungicida comparable con los efectos que los Triazoles poseen; esto a pesar de que en las evaluaciones con conidias obtuvo efectos muy superiores a los de estos últimos a bajas concentraciones, pero la evaluación efectiva de la actividad fungicida de un compuesto sobre *M. fijiensis* se realiza en base a los resultados obtenidos sobre ascosporas, debido a que esta es la estructura reproductiva de mayor importancia en el ciclo infeccioso de la enfermedad.

De acuerdo con las directrices del Comité de Acción contra la Resistencia a los Fungicidas (FRAC), para que un fungicida Triazol sea considerado efectivo para el control de *M. fijiensis*, la CI_{50} debe encontrarse en niveles cercanos o inferiores a los 0.01ppm. De los fungicidas evaluados durante los ensayos, prácticamente todos se mantienen dentro de este rango o cercanos a él; no obstante, el PBO no se acerca siquiera a un

valor de CI_{50} válido. Debido al tipo de interacción entre el Citocromo P-450 y el PBO se esperaba que este compuesto se comportara de forma similar a como lo hacen los Triazoles, sin embargo no lo hizo, y por medio de extrapolación se logró determinar que la máxima inhibición esperable producida por el PBO es del 43.7%. De forma que, si se considera al PBO como un compuesto relacionado con los Triazoles por su sitio de acción, no puede ser considerado efectivo de acuerdo a los resultados de los experimentos conducidos.

Por otra parte, cuando el PBO fue evaluado en mezclas con los fungicidas triazoles en ascosporas, una reducción de la efectividad de estos fue observada, con excepción de los tratamientos con Bitertanol, en dónde en una proporción 40:1 se observó un efecto superior estadísticamente diferente del tratamiento control. Es importante notar que los tratamientos con Bitertanol fueron todos estadísticamente distintos de los tratamientos con otros fungicidas.

La reducción en la efectividad de los triazoles al ser mezclados con PBO podría explicarse parcialmente por el Efecto Bifásico

de este compuesto cuando interactúa con el Citocromo P-450¹. Al poseer el PBO un efecto fungicida, aún cuando este se pequeño, se esperaría que en mezcla con otro fungicida la efectividad en conjunto se incrementara debido a una relación de aditividad; no obstante, debido a la Respuesta Bifásica del PBO, este primero inhibe la acción del Citocromo (en esta fase podría ser aditivo), pero después actúa como estimulante del mismo, pudiendo actuar como antagonista del fungicida.

Sin embargo, es interesante notar que la respuesta con el Bitertanol fue estadísticamente distinta a la observada con los demás fungicidas. En el caso del Fenbuconazol y Propiconazol, el máximo de inhibición obtenido con las mezclas se alcanzó en las proporciones 30:1 y 20:1, respectivamente, en ambos casos los porcentajes de inhibición representaban puntos máximos de la curva, con valores inferiores a ellos a ambos lados. Por otra parte, en el caso del Bitertanol la mayor inhibición se observó en la proporción de 40:1; sin embargo, no se podría definir el porcentaje de inhibición obtenido a este nivel como el valor máximo esperable, puesto que no se evaluaron proporciones superiores, de forma que existe la probabilidad de que el

¹ Ver Capítulo 3 sección 3.2

porcentaje de inhibición siga incrementándose y que el valor máximo de inhibición se exprese en proporciones superiores.

Lo antes mencionado permite plantear que la relación entre el efecto inhibitor y el efecto estimulante del PBO sobre el Citocromo genera efectos diferentes de acuerdo al compuesto fungicida con el cual se mezcla.

Es importante notar que en las aplicaciones tradicionales del PBO como sinergista de los insecticidas, la fase estimulante no ejerce ninguna influencia en la efectividad total del insecticida, puesto que una vez que el PBO deprimió la actividad del Citocromo, el insecto no posee defensas metabólicas y para cuando el efecto estimulante se presente ya el insecticida habrá hecho su efecto. Por otra parte, la morfología y el metabolismo de los hongos es mucho más distinto, de forma que el hongo es capaz de sobrevivir a la inhibición inicial y beneficiarse de la estimulación subsiguiente, debido a que los sitios de acción se encuentran distribuidos de forma más dispersa en todo el micelio, y no concentrados en un solo sitio como en los insectos.

En los ensayos desarrollados con conidias, a pesar de no ser representativos para evaluar la efectividad fungicida sobre *M. fijiensis*, permiten obtener información adicional para reforzar la idea de la influencia de la Respuesta Bifásica sobre el comportamiento del PBO durante los ensayos.

En los ensayos donde el PBO se evaluó solo, después de un efecto inhibitorio notablemente superior al de los triazoles, una fase estimulante se puso de manifiesto de forma también notoria.

Por otra parte, cuando fue evaluado en mezcla con los Triazoles, el efecto general fue estadísticamente semejante o superior al control fungicida, según el compuesto evaluado. En este caso, las diferencias entre los efectos inhibitorios debidos a cada compuesto, a pesar de que existieron, no fueron tan notables como en el caso de las pruebas con ascosporas.

Finalmente, es importante notar que a pesar de algunos efectos superiores observados, la información obtenida no es suficiente para proyectar el uso efectivo de este compuesto para el control de hongos; es necesario evaluar una gran cantidad de factores

adicionales para determinar efectos más específicos sobre distintos organismos, condiciones de experimentación y compuestos fungicidas asociados que permitan validar tales proyecciones. Hasta el momento, los resultados no demuestran la existencia de alguna aplicación efectiva de este compuesto en el control de hongos como *Mycosphaerella fijiensis*.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones.-

1. El Butóxido de Piperonilo produce un efecto inhibitorio en el crecimiento del tubo germinativo de ascosporas de *Mycosphaerella fijiensis*, cultivadas in vitro; sin embargo, este no alcanza los niveles necesarios para ser considerado un compuesto fungicida, y no posee un valor de CI_{50} válido. Por otra parte, el efecto sobre el crecimiento de colonias originadas a partir de conidias presenta una doble fase, inhibitoria – estimulante, a bajas y altas concentraciones, respectivamente.

2. El Butóxido de Piperonilo posee un efecto modificador de la efectividad fungicida de los Triazoles sobre ascosporas y conidias cultivadas in vitro, observándose una modificación en sentido positivo y negativo, de acuerdo al triazol con el que se realiza la mezcla, y la proporción de mezcla.
3. El Butóxido de Piperonilo incrementa la efectividad del Bitertanol en la inhibición del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* y colonias cultivadas in vitro a partir de conidias. El Bitertanol se comportó de forma distinta a los otros dos triazoles evaluados, mostrando un efecto superior y deseable sobre la variable respuesta en la mayoría de los tratamientos
4. Las curvas de respuesta de las mezclas Butóxido de Piperonilo : Triazol se comportan de forma distinta según cada ingrediente activo, dentro del intervalo de proporciones de mezcla evaluadas.
5. Existen efectos debidos a las interacciones entre los compuestos con los cuales se mezcla el Butóxido de

Piperonilo y la proporción de mezcla en la inhibición del crecimiento de colonias y ascosporas de *M. fijiensis* cultivadas in vitro.

6.2. Recomendaciones.-

1. Estudiar el efecto del Butóxido de Piperonilo bajo nuevas condiciones de experimentación y sobre otras especies de hongos.
2. Determinar si el efecto inhibitorio del Butóxido de Piperonilo sobre el crecimiento del tubo germinativo de ascosporas observado en este trabajo se debe a propiedades fungitóxicas o fungiestáticas del compuesto.
3. Evaluar mezclas de Butóxido de Piperonilo con otros fungicidas y familias fungicidas para determinar si existen compuestos con los que el Butóxido de Piperonilo puede expresar un nivel aditividad mayor.
4. Estudiar el efecto del factor Proporción de mezcla del Butóxido del Piperonilo con el Bitertanol y determinar el punto máximo de la curva de respuesta.

5. Validar la hipótesis propuesta que supone que los efectos inhibidores – estimulantes observados en los ensayos realizados en este trabajo son consecuencia de la Respuesta Bifásica del Butóxido de Piperonilo cuando interactúa con el Citocromo p-450.

6. Estudiar la magnitud de la relación inhibición : estímulo de la Respuesta Bifásica del Butóxido de Piperonilo y su implicación en la aditividad de efectos fungicidas cuando se mezcla con otros compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G, Fitopatología. Uteha – Noriega editores. 638p, 1999.
2. ARNOLD, DAVID. The Fate and Behavior of Piperonyl Butoxide in the Environment. *En* Glynn Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 105-119. 1998.
3. BREATHNACH, RORY. The Safety of Piperonyl Butoxide. *En* Glynn Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 9-39. 1998.
4. BRENTH, KEITH, Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be managed? (FRAC monograph No. 1), GCPF-Bruselas, 1995.
5. BRENTH, KEITH; HOLLOMON, DEREK, Fungicide Resistance: The Assessment of Risk. (FRAC monograph No. 2), GCPF-Bruselas, 1998.

6. BUCHENAUER, H, Mechanism of Action of Triazolyl Fungicides and Related Compounds. *En*: Lyr, H, ed, Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanism of Action. pp 205-231. 1987.
7. CASIDA, J. Forewords. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. Academic Press, pp. x-xi. 1998.
8. COCKBURN, ANDREW; NEEDHAM, DAVID. The Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Piperonyl Butoxide in Mammals. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 137-151. 1998.
9. DI BLASI, GIOVANNA. A Review of the Chemistry of Piperonyl Butoxide. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 55-70. 1998.
10. FARNHAM, ANDREW. The Mode of Action of Piperonyl Butoxide with Reference to Studying Pesticide Resistance. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 199-213. 1998.
11. FORBES, GREG, Resistencia a los Fungicidas. Teoría y Práctica. *En*: Fernández-Northcote, E., ed. Memorias del Taller: Complementando la Resistencia al Tizón en los Andes, 2001
12. FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE, 1998 Status Report and Recommended Fungicide Resistance Management Guidelines. 1998.
13. FUNGICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE, FRAC Fungicide List (1). FRAC. 2003.

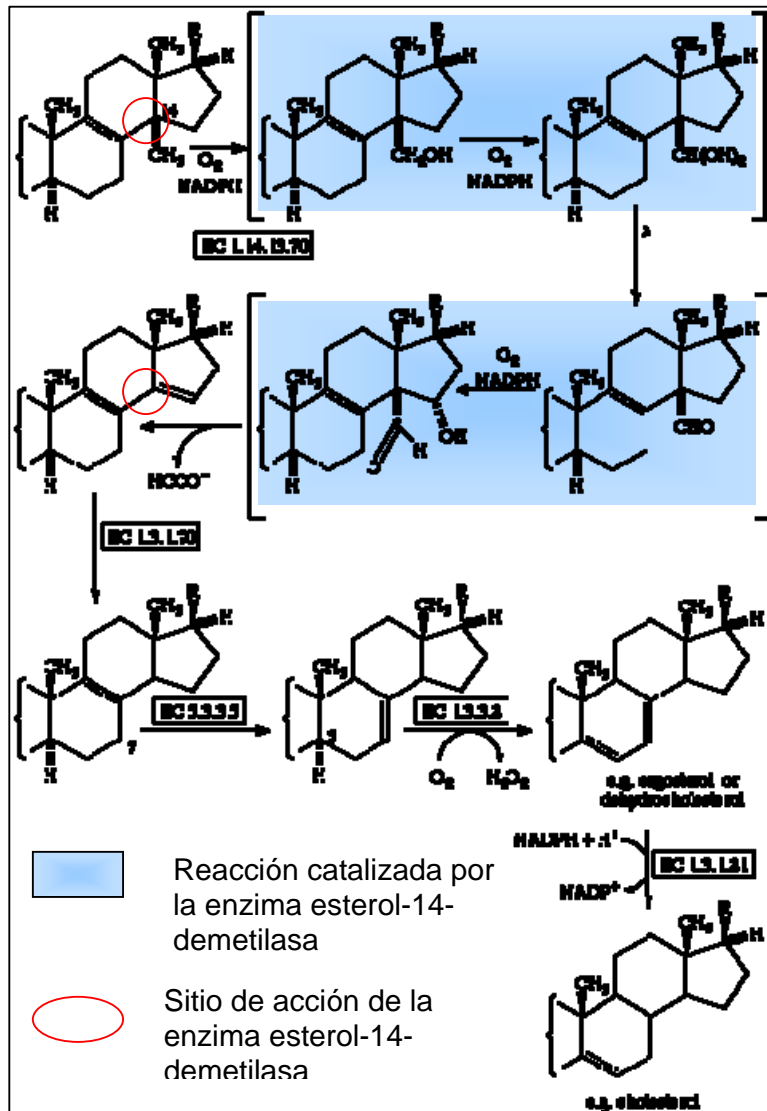
14. GALLARDO, MOGENS, Enzimas Citocromo P450. En: Universidad de Concepción. Tópicos de Ciencias Ambientales. Universidad de Concepción Centro-EULA. 2004.
15. GLYNNE-JONES, A. Some lesser known properties and potential new uses of Piperonyl butoxide *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 301-310. 1998.
16. GLYNNE-JONES, ANTONIA. Some Lesser Known Properties and Potential New Uses of Piperonyl Butoxide. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 301-310. 1998.
17. GUERRERO, E; SILVA, H; CORRALES, J. Susceptibilidad de *Sitophilus zeamais* a insecticidas y butóxido de piperonilo en dos sustratos alimenticios. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 67:51-57. 2003.
18. HARBACH, C. *et al.* Photolytic Degradation of Piperonyl Butoxide. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 82-104. 1998.
19. HODGSON, ERNEST; LEVI, PATRICIA, Interactions of Piperonyl Butoxide with Cytochrome P-450 *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl Butoxide: The insecticide synergist. pp. 41-53. 1998.
20. INIBAP; CORBANA; CATIE; EARTH, Abstracts: 2nd International Workshop on *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot diseases of bananas. INIBAP. 2002.

21. LUSBY, P, Pesticide Chemistry: Lecture Notes. _____. 2003.
22. MALGOR-VALSECIA, Agentes Antimicóticos Sistémicos. _____. 2003.
23. MARTIN, DOUGLAS *et al.*, Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. Plant Disease Vol. 87 No. 3. APS press, 2003.
24. MOURICHON, X; CARLIER, J; FOURÉ, E, Sigatoka Leaf Spot Diseases. *Musa* Disease Fact Sheet No. 8. INIBAP – PROMUSA, 1997.
25. NAVIA, D, Características bioquímicas de los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del esterol (SBI). _____. 4p. 2000
26. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Datos de la FAOSTAT. 2004.
27. SÁDABA, B, GARCÍA-QUETGALS, E; AZANZA, J, Relación entre Estructura y Función de los Azoles. Revista Española de Quimioterapia, Vol. 17 No. 1. 2004
28. STEWART, DUNCAN. The Evaluation of Synergistic Action in the Laboratory and Field. *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. pp. 173-198. 1998.
29. TOZZI, A. A brief history of the development of Piperonyl butoxide as an insecticide synergist *En* Glynne Jones, D, ed. Piperonyl butoxide: The insecticide synergist. Academic Press, pp. 1- 5. 1998.
30. VANDEN-BOSSCHE, HUGO, Mechanisms of Antifungal Resistance. Revista Iberoamericana de Micología. 14:44-49. 1997.

31. WERCK-REICHHART, DANIÈLE; FEYEREISEN, RENÉ, Cytochrome P-450: A Success Story. *Genome Biology*, Vol.1 No. 6. 2000.
32. http://www.brenda.uni-koeln.de/php/flat_result.php4?ecno=1.14.13.70
33. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/terp/cholesterol.html>

ANEXO 1

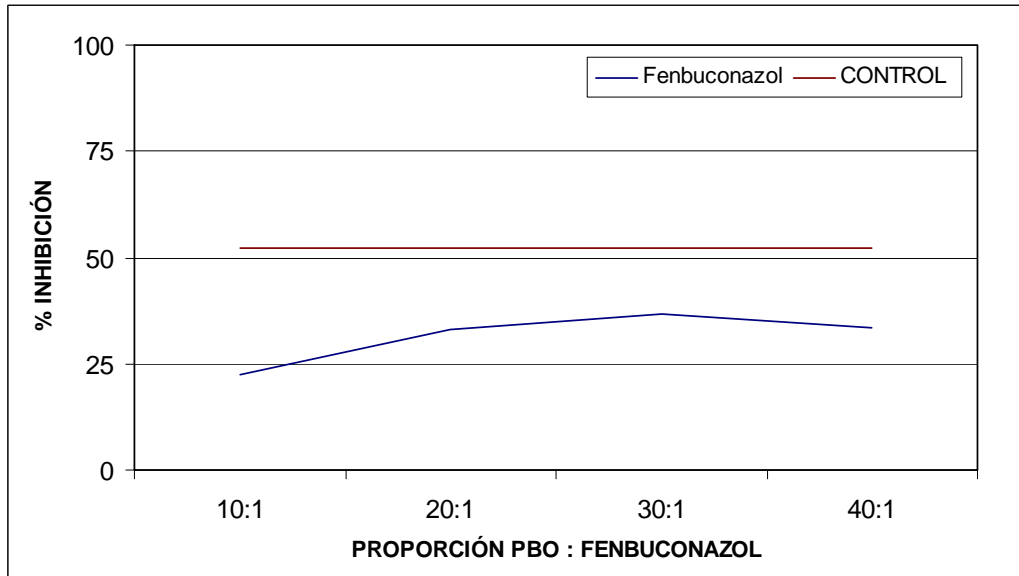
BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL A PARTIR DE LA DEMETILACIÓN DEL CARBONO 14*



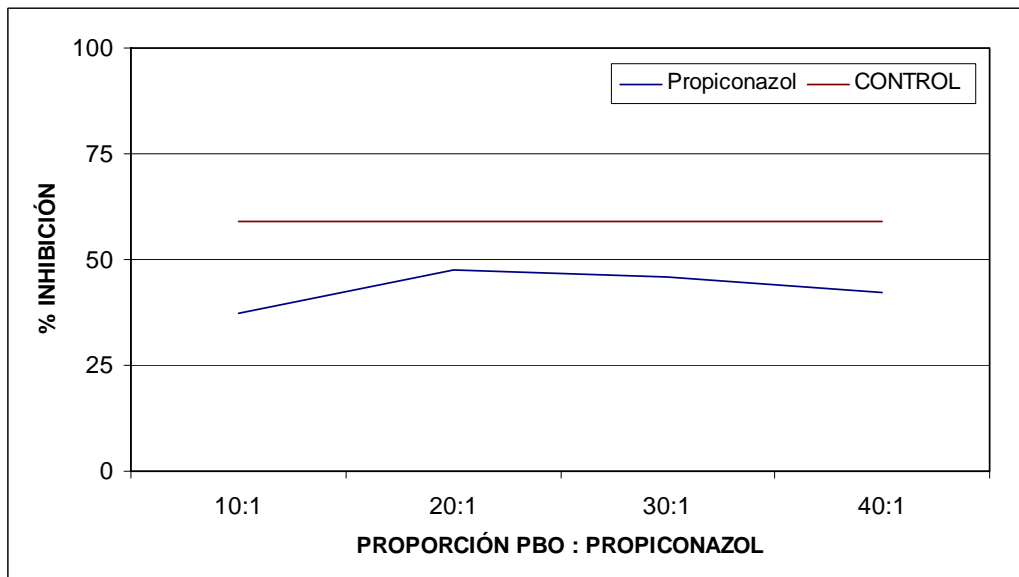
*La Biosíntesis del Colesterol esquemáticamente es representativa de la Biosíntesis del Ergosterol y otros Esteroles.

ANEXO 2

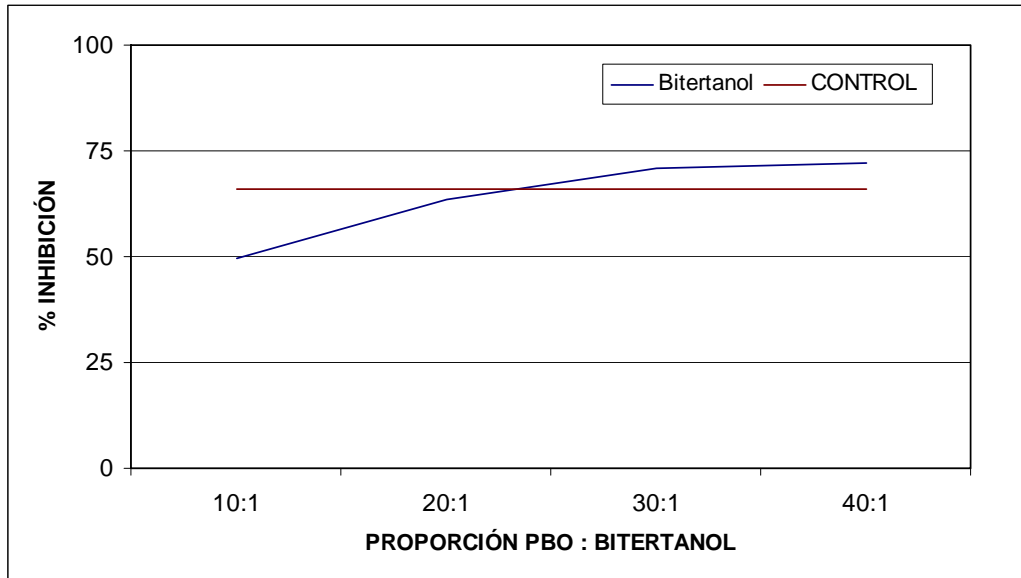
CURVAS DE RESPUESTA PARA DISTINTAS PROPORCIONES DE MEZCLA PBO : TRIAZOLES EN ASCOSPORAS Y CONIDIAS



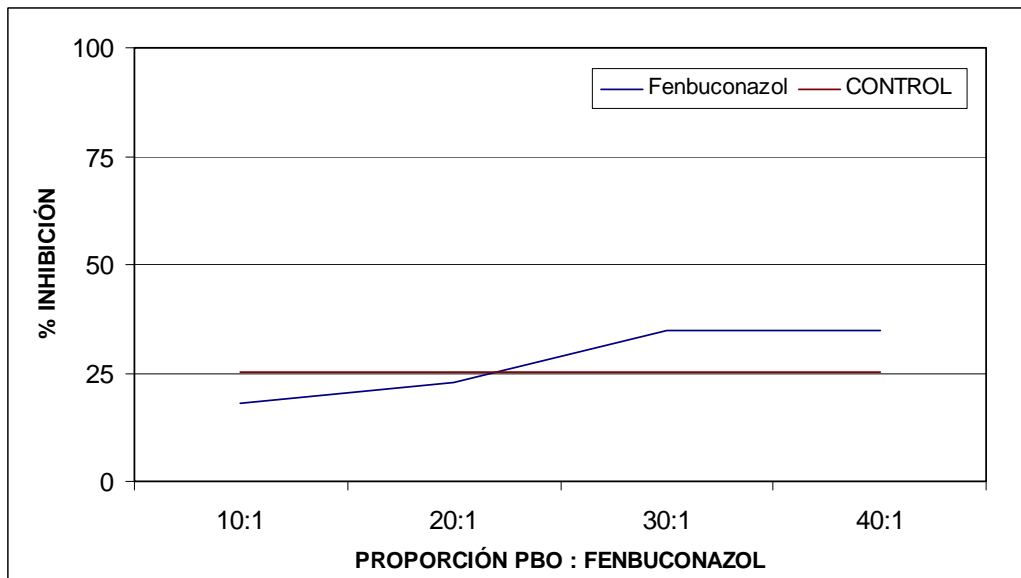
FENBUCONAZOL (ASCOSPORAS)



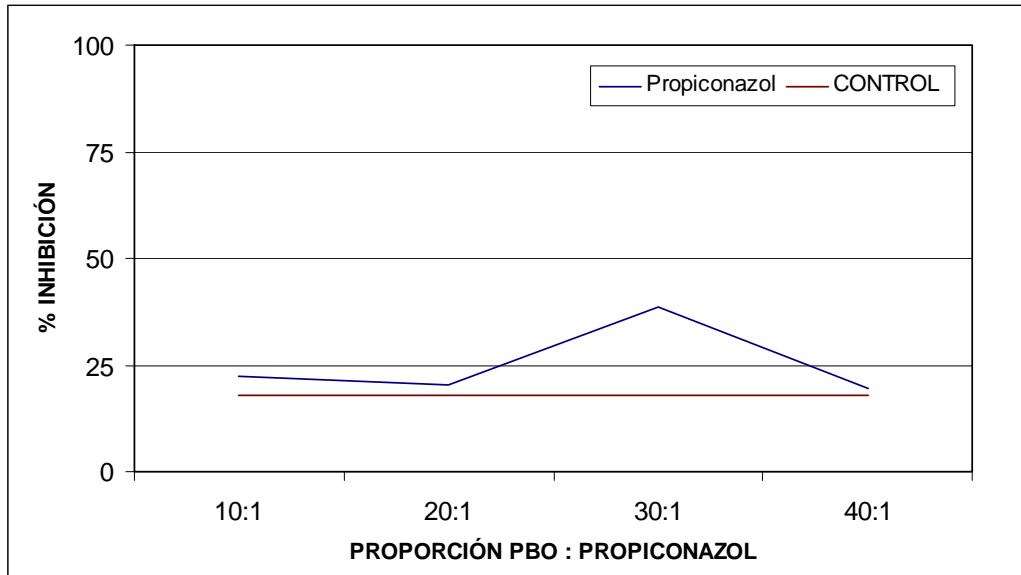
PROPICONAZOL (ASCOSPORAS)



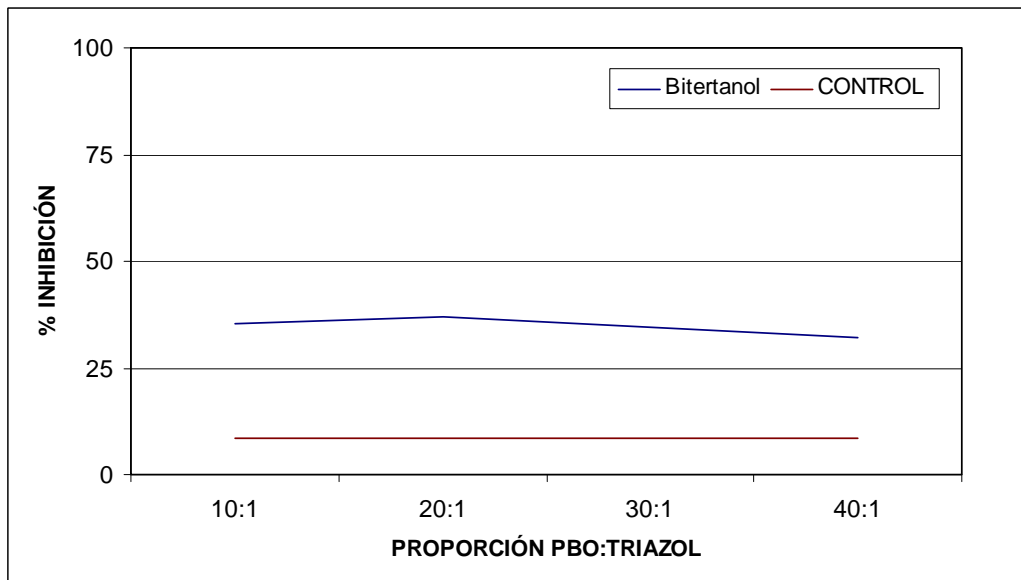
BITERTANOL (ASCOSPORAS)



FENBUCONAZOL (CONIDIAS)



PROPICONAZOL CONIDIAS



BITERTANOL (CONIDIAS)