

Efecto del Butóxido de Piperonilo y Sus Mezclas con Fungicidas Triazoles sobre el Crecimiento In Vitro de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Eduardo Chica¹, Daniel Navia, Haydeé Torres², Miguel Quilambaqui,
Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción
Escuela Superior Politécnica del Litoral
Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador
¹jchica@espol.edu.ec, ²iagrop@espol.edu.ec,

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 incrementado 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.

Palabras Claves: Butóxido de Piperonilo, Citocromo P-450, Triazol, *Mycosphaerella fijiensis*, Fungicidas, Potenciadores.

Abstract

The effect of Piperonyl Butoxide (PBO), a widely known insecticide synergist, was evaluated on the micelial growth of *Mycosphaerella fijiensis* to validate the hypothesis which suggests that this compound has some antifungal effect due to its interactions with Cytochrome P-450, the same site of action of triazole fungicides. Trials oriented to evaluate the effect of PBO, alone and mixed with triazoles, were conducted. It was determined that PBO has a weak antifungal activity on the fungus' growth when it is grown from sexual spores (ascospores), and a double effect, as inhibitor and stimulator, when it develops from asexual spores (conidia). Additionally, PBO modifies the fungicide action of triazoles by increasing their antifungal effectiveness, in some cases, and depressing it in others. Triazole antifungal effect modification due to PBO mixing seems to depend on two factors, the triazole molecule and the mix proportion of both compounds. PBO do not shows adequate control levels to be considered as a fungicide per se, but some potentialities were observed on its interactions with triazoles.

1. Introducción

El Butóxido de Piperonilo es un conocido sinergista de la acción de los insecticidas, principalmente los piretroides [2,5]; debe su acción sinérgica al grupo Metiléndioxifenil presente en su molécula, el cual inhibe la acción de numerosas enzimas pertenecientes al complejo Citocromo P-450 [6]. Por otra parte, una de las enzimas de este complejo, la esteroil-14-demetilasa (E.C. 1.14.13.70) constituye el sitio de acción de los fungicidas Triazoles, un grupo de fungicidas ampliamente utilizados para el control de numerosas enfermedades de los cultivos [8,12,14]. No

obstante, desde mediados de la década de 1980, estos fungicidas han experimentado una reducción de su efectividad debido a la expresión de mecanismos de resistencia en los hongos, provocando problemas en el control de las enfermedades asociadas con ellos [1].

En Ecuador, el principal impacto de la reducción de la efectividad de los fungicidas triazoles se observa en el control de la enfermedad de la Sigatoka Negra del Banano, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Desde la década de 1980, este patógeno ha experimentado una rápida expansión, llegando actualmente a estar presente en todos los países donde se cultiva banano en el mundo

[13]. También se ha reportado ampliamente la reducción de la susceptibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a diversos grupos fungicidas, incluyendo a los triazoles [3,10]; llegando incluso a presentarse problemas de resistencia completa a ciertos ingredientes activos como ya ocurrió en el caso de los Benzimidazoles a mediados de la década de 1990 [1].

Tradicionalmente para el control químico de *Mycosphaerella fijiensis* se han utilizado numerosos ingredientes activos, no obstante el grupo de triazoles es el que ha sido utilizado durante los últimos 20 años con mayor amplitud. El grupo de fungicidas triazoles presenta la desventaja de ser reconocido rápidamente por los microorganismos patógenos, lo que les permite desarrollar mecanismos de resistencia contra ellos [1,9,15]; por otra parte, ventajosamente, los patrones de resistencia expresados para estos compuestos permiten mantener su uso puesto que se ha observado que la resistencia en este grupo no ocurre de forma súbita, sino que se presenta como una reducción progresiva de la sensibilidad del hongo al ingrediente activo [1,9].

En respuesta a la situación anteriormente señalada se están realizando esfuerzos globales por establecer metodologías apropiadas para el manejo del problema de la resistencia a productos fungicidas en los microorganismos fitopatógenos [1,3,7]; además se están evaluando nuevas metodologías de control que incluyen prácticas culturales adecuadas, desarrollo de variedades de banano resistentes a la enfermedad, mejoramiento de las medidas cuarentenarias y métodos de control microbiológico [11].

Sin embargo, una de las tecnologías que siempre serán necesarias para el control de la enfermedad en plantaciones comerciales es la aplicación de fungicidas sintéticos, por lo que el desarrollo de nuevos compuestos que permita evitar la actual dependencia de uno o dos grupos químicos en los programas de control de las enfermedades será de gran utilidad para el manejo de las poblaciones de microorganismos resistentes [1].

El objetivo de este trabajo fue determinar si el Butóxido de Piperonilo poseía algún efecto fungicida sobre el crecimiento de *M. fijiensis*, y así mismo evaluar el efecto producido sobre la actividad fungicida de los triazoles cuando se aplican mezclas de estos compuestos con Butóxido de Piperonilo. Este trabajo constituye uno de los primeros esfuerzos orientados a estudiar los efectos del Butóxido de Piperonilo en los microorganismos.

2. Materiales y Métodos

Se consideró la ejecución de dos experimentos individuales para dar cumplimiento a los objetivos planteados. En primer lugar, se evaluó el efecto del Butóxido de Piperonilo (BOP) en solitario, y se comparó el efecto observado con los efectos de tres

triazoles evaluados también en solitario. Posteriormente, se realizó otro ensayo en el que se evaluaron cuatro proporciones de mezcla de BOP con los tres triazoles utilizados en el ensayo anterior. Todos los experimentos fueron desarrollados en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), siguiendo los procedimientos estandarizados del laboratorio de Fitopatología de dicho centro.

2.1. Evaluación del efecto del BOP en solitario

Se utilizaron cuatro tratamientos del factor ingrediente activo: Fenbuconazol, Propiconazol, Bitertanol y BOP. Estos tratamientos fueron evaluados individualmente a cuatro concentraciones distintas: 0.01, 0.1, 1.0 y 5.0 mg·ℓ⁻¹. Adicionalmente, el tratamiento BOP fue evaluado en tres concentraciones adicionales (10, 100 y 1000 mg·ℓ⁻¹). Todos los tratamientos fueron evaluados utilizando las dos estructuras reproductivas del hongo (ascosporas y conidias). La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición del crecimiento del tubo germinativo y del radio de la colonia para los experimentos evaluados con ascosporas y conidias, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron en base a Diseños Completamente Aleatorizados, con cincuenta observaciones por cada tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por una ascospora germinada o una colonia, según la estructura de la estructura reproductiva que se estuviera evaluando. Para reducir el error, se escogieron las cincuenta unidades experimentales a partir de ascosporas o colonias cultivadas en cinco cajas Petri distintas. Para los análisis estadísticos, se transformaron las observaciones sumando el valor de 100 a todos los valores de la variable respuesta para eliminar los términos negativos.

En el caso de los tratamientos evaluados sobre ascosporas, éstas fueron sembradas a través del método de descarga de ascosporas [4]. Las descargas se realizaron sobre medio de cultivo Agar-Agua enmendado con la concentración del ingrediente activo correspondiente al tratamiento. Las ascosporas fueron evaluadas después de 48 horas de incubación a 26°C, bajo condiciones de oscuridad. Se midió la longitud del tubo germinativo más largo utilizando una retícula micrométrica ubicada en el ocular de un microscopio invertido, el aumento del objetivo de trabajo fue de 32X. En estos tratamientos, adicionalmente se construyó una curva de sensibilidad para cada uno de los ingredientes activos evaluados, y se determinó para cada uno la concentración media inhibitoria (CI₅₀).

Por otra parte, para el caso de los tratamientos evaluados a partir de conidias, estas fueron sembradas a partir de una suspensión de conidias previamente preparada. En este caso, las conidias fueron sembradas sobre medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar,

enmendado con la correspondiente concentración de ingrediente activo. Las colonias formadas a partir de estas conidias fueron evaluadas después de 5 días de incubación a 26°C bajo un régimen de 24 horas de luz blanca. El radio de las colonias se midió utilizando el mismo instrumental usado en el caso de los tratamientos sobre ascosporas.

En ambos casos, tanto para los tratamientos con ascosporas como para los tratamientos con conidias, se realizaron Análisis de Varianza para la variable respuesta en cada concentración evaluada y para establecer rangos de significancia se utilizó una prueba de Tukey al 0.05%. Además, se realizó otro análisis de varianza para encontrar diferencias entre los efectos de las distintas concentraciones de BOP; la misma prueba de significancia fue aplicada.

2.2. Evaluación del efecto de las mezclas BOP : Triazoles

El material biológico, las condiciones de incubación y los métodos de siembra y evaluación utilizados para este experimento fueron los mismos que se describieron en la sección anterior. Se evaluaron los factores Ingrediente Activo y Proporción de Mezcla BOP : triazol en tres y cuatro niveles respectivamente. Se utilizaron los mismos niveles del factor Ingrediente Activo descritos anteriormente. El factor Proporción de Mezcla BOP : triazol fue evaluado en los niveles 10:1, 20:1, 30:1 y 40:1, a partir de una concentración única de triazol equivalente a 0.1 mg·ℓ⁻¹. Todos los análisis se realizaron a partir de Diseños Completamente Aleatorizados. Se realizó un Análisis de Varianza de la variable respuesta para el factorial Ingrediente Activos x Proporción de Mezcla BOP : Triazol, y se establecieron niveles de significancia con una prueba de Tukey al 0.05%. Adicionalmente, se practicaron Análisis de Varianza individuales en cada nivel del factor Ingrediente Activo para encontrar diferencias entre los efectos de los niveles del factor Proporción de mezcla, en este Análisis se incluyó el tratamiento correspondiente a la concentración 0.1 mg·ℓ⁻¹ de cada ingrediente activo (excepto el BOP) del ensayo como tratamiento testigo. La prueba de Tukey al 0.05% también fue utilizada en esta ocasión para establecer rangos de significancia.

3. Resultados

3.1. Evaluación del efecto del BOP en solitario

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas en todas las concentraciones evaluadas entre los niveles del factor Ingrediente Activo, para los cultivos desarrollados a partir de ascosporas y conidias. Las pruebas de Tukey permitieron establecer que el BOP exhibió un porcentaje de inhibición

menor, y diferente estadísticamente, al de los triazoles en los tratamientos desarrollados con ascosporas (Tabla 1). En los tratamientos desarrollados sobre conidias se observó un doble efecto, a concentraciones de 0.01 y 0.1 mg·ℓ⁻¹ el BOP mostró un porcentaje de inhibición superior y diferente estadísticamente que los triazoles, mientras que en las demás concentraciones mostró un porcentaje de inhibición menor (negativo) y diferente estadísticamente que el mostrado por los triazoles. El porcentaje de inhibición negativo es interpretado como un efecto estimulante sobre el crecimiento del micelio del hongo en lugar de un efecto inhibidor (Tabla 2).

Tabla 1. Porcentajes de inhibición promedio del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas

Ingrediente Activo	Concentración [mg·ℓ ⁻¹]			
	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
<i>S_d</i>	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 $p = 0.05$.

Tabla 2. Porcentajes de inhibición promedio del crecimiento de colonias cultivadas a partir de conidias

Ingrediente Activo	Concentración [mg·ℓ ⁻¹]			
	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
<i>S_d</i>	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, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los distintos niveles de concentración del Ingrediente Activo BOP. La prueba de Tukey reveló que existen tres niveles de significancia entre los niveles de concentración de BOP cuando se evalúa el crecimiento de ascosporas, mientras que, existen dos niveles de significancia cuando se evalúa el crecimiento de colonias a partir de conidias. Cabe notar que en este último caso las dos concentraciones en las que se observó inhibición fueron estadísticamente iguales, y las cuatro restantes concentraciones (en la que se observó estímulo) fueron también estadísticamente iguales entre sí.

En los experimentos desarrollados sobre ascosporas, los valores de CI₅₀ calculados para los Triazoles se mantuvieron dentro o cerca del rango admisible para este grupo de fungicidas (≤ 0.01 mg·ℓ⁻¹) [3], mientras que, no fue posible establecer un valor de

CI₅₀ válido para el BOP. Extrapolando la función de regresión logarítmica de las observaciones del BOP (R²=0.85) se logró determinar que este compuesto no produce a ningún nivel de concentración el 50% de inhibición del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas; el porcentaje máximo de inhibición calculado fue de 43.7%, al 100% de concentración. Este cálculo no se ejecutó para los tratamientos desarrollados sobre conidias debido a la falta de representatividad de los resultados que se pudieran obtener, considerando que la principal vía de diseminación de *M. fijiensis* son sus esporas sexuales.

3.2. Evaluación del efecto de las mezclas BOP : Triazoles

Cuando se evaluaron las mezclas de BOP con los triazoles sobre ascosporas se observó una reducción general del porcentaje de inhibición de los fungicidas triazoles respecto a los niveles observados con los productos puros. Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los niveles de cada uno de los factores evaluados y para la interacción entre ellos. La prueba de Tukey reveló la presencia de seis niveles de significación para este tratamiento. Además, también se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre los niveles del factor Proporción de Mezcla y el testigo fungicida, cuando se evaluó cada ingrediente activo por separado. Sólo en el caso del Bitertanol se observó un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de inhibición del tubo germinativo de ascosporas (Tabla 3).

Por otra parte, cuando se evaluaron las mezclas sobre el crecimiento de colonias a partir de conidias, también se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los niveles de cada factor, y para la interacción entre ellos. En los análisis realizados en cada uno de los niveles del factor Ingrediente Activo de forma individual, se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los niveles del factor Proporción de Mezcla y el testigo fungicida. En esta ocasión se observó al menos un nivel estadísticamente superior al testigo en cada ingrediente activo evaluado. El mayor valor de la variable respuesta se observó con Propiconazol a una proporción de mezcla de 30:1 (BOP : Propiconazol), sin embargo, el ingrediente activo que expresó un efecto mayor sobre la variable respuesta, de forma global, fue el Bitertanol, en el cual todos los niveles de Proporción de Mezcla evaluados fueron superiores al testigo (Tabla 4).

Tabla 3. Porcentajes de inhibición promedio del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas

	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
<i>S_d</i>	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 $p = 0.05$.

Tabla 4. Porcentajes de inhibición promedio del crecimiento de colonias cultivadas a partir de conidias

	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
<i>S_d</i>	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 $p = 0.05$.

4. Discusión

Como se puede observar en los resultados, en ningún tratamiento evaluado se pudo notar que el BOP 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 [11].

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 CI₅₀ debe encontrarse en niveles cercanos o inferiores a los 0.01 mg·ℓ⁻¹ [3]. De los fungicidas evaluados durante los ensayos, prácticamente todos se mantienen dentro de este rango o cercanos a él; no obstante, el BOP no se acerca siquiera a un valor de CI₅₀ válido. Debido al tipo de interacción entre el Citocromo P-450 y el BOP se esperaba que este compuesto se comportara de forma similar a como lo hacen los Triazoles, sin embargo no lo hizo, y de acuerdo al porcentaje máximo de inhibición calculado por extrapolación (43.7%), si se considera al BOP como un compuesto relacionado con los Triazoles debido al sitio metabólico en el cual

ejerce su acción, este compuesto no podría ser considerado como un fungicida efectivo para el control de *M. fijiensis*.

Por otra parte, cuando el BOP 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 donde en una proporción 40:1 se observó un efecto superior estadísticamente diferente del tratamiento testigo. Es importante notar que los tratamientos que contenían mezclas con Bitertanol fueron todos estadísticamente distintos y superiores a los tratamientos con otros fungicidas.

La reducción en la efectividad de los triazoles al ser mezclados con BOP podría explicarse posiblemente por una particularidad del compuesto cuando interactúa con el Citocromo P-450, conocida como *Respuesta Bifásica* del BOP [6]; esta particularidad consiste en que el BOP es capaz de inhibir fuertemente la actividad al Citocromo cuando entra inicialmente en contacto con este, para luego convertirse en un agente estimulante del mismo. El mecanismo mediante el cual el BOP ejerce su acción sobre el complejo Citocromo P-450 aún no está concluyentemente establecido, pero según una hipótesis propuesta por Dhal & Hodgson (1979), el BOP no es directamente quién inhibe la acción del Citocromo, sino que inicialmente actúa como sustrato de estas enzimas, para posteriormente en un paso intermedio de la reacción formar el verdadero metabolito inhibitorio del Citocromo; consecuentemente, una vez concluida la reacción el metabolito intermediario se convertirá en producto y probablemente es este producto final quien estimula la actividad del Citocromo después de la inhibición inicial. De esta forma, según los resultados de las evaluaciones del BOP en solitario, 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 BOP, 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.

No obstante, es interesante notar que la respuesta de las mezclas con Bitertanol (en ascosporas) fue estadísticamente distinta a la observada con los demás fungicidas. En el caso del Fenbuconazol y Propiconazol, en ciertas proporciones de mezclas los porcentajes de inhibición representaron puntos máximos de una curva de respuesta, con valores inferiores a ellos a proporciones de mezcla mayores y menores. Por otra parte, en el caso del Bitertanol la mayor inhibición se observó en la proporción de mezclas más alta (40:1); sin embargo, no se puede definir que este valor represente un punto máximo de la curva de respuesta, debido a que no se evaluaron proporciones de mezcla mayores, de forma que existe

la probabilidad de que el 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 inhibitorio y el efecto estimulante del BOP sobre el Citocromo genera efectos diferentes de acuerdo al compuesto fungicida con el cual se mezcla.

Es importante resaltar que en las aplicaciones tradicionales del BOP como sinergista de los insecticidas, la fase estimulante no ejerce ninguna influencia en la efectividad total del insecticida, puesto que una vez que el BOP 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 BOP durante los ensayos. En los ensayos donde el BOP se evaluó solo, después de un efecto inhibitorio notablemente superior al de los triazoles, se pudo observar una fase estimulante igualmente notoria.

Por otra parte, las mezclas evaluadas sobre conidias, 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, 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*.

12. Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), en

especial al área de Fitopatología y a la M.Sc. Ma. Isabel Jiménez, por el apoyo brindado en la realización de los experimentos; así como también a la Dra. Giovanna Di Blasi y a la compañía ENDURA (Italia) por las facilidades para obtener las muestras de Butóxido de Piperonilo y por el soporte brindado para esta investigación.

13. Referencias

- [1] Brenth, K., Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can It be Managed? (FRAC monograph No. 1), GCPF-Bruselas, 1995.
- [2] Casida, J., Forewords, *en*: Glynn Jones, D, ed. Piperonyl Butoxide: The insecticide Synergist, Academic Press, 1998, pp. x-xi.
- [3] Fungicide Resistance Action Committee, 1998 Status Report and Recommended Fungicide Resistance Management Guidelines. 1998.
- [4] Gómez, D., Prins, C., Staver, C., Metodología para la Manipulación In Vitro de *Mycosphaerella fijiensis*, Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, no. 53, 1999, disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip53/>
- [5] 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, no. 67, 2003, pp. 51-57
- [6] Hodgson, E., Levi, P., Interactions of Piperonyl Butoxide with Cytochrome P-450, *en* Glynn Jones, D, ed. Piperonyl Butoxide: The insecticide synergist, Academic Press, 1998, pp. 41-53.
- [7] Knight, S., Wirz, M., Amil, A., Hall, A., Papel del Manejo de la Resistencia a Funguicidas en el Mantenimiento de la Eficacia de las Estrategias Integradas para el Control de la Sigatoka Negra, *en*: INIBAP/CORBANA/EARTH/CATIE. Abstracts: 2nd International Workshop on *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot diseases of bananas, INIBAP, 2002, pp. 42-43.
- [8] Lusby, P., Pesticide Chemistry: Lecture Notes. _____, 2003.
- [9] Malgor-Valsecia, Agentes Antimicóticos Sistémicos. _____, 2003.
- [10] Martin, D. et al., Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation, Plant Disease, Vol. 87, No. 3, 2003, APS press.
- [11] Mourichon, X., Carlier, J., Fouré, E., Sigatoka Leaf Spot Diseases, Musa Disease Fact Sheet No. 8, INIBAP - PROMUSA, 1997.
- [12] Navia, D., Características Bioquímicas de los Fungicidas Inhibidores de la Biosíntesis del Esterol (SBI). _____, 2000.
- [13] Romero, A., Propagación, Detección e Impacto de la Sigatoka Negra y Otras Enfermedades Foliareas Causadas por *Mycosphaerella sp.* de Bananos en la Década de los 90, *en*: INIBAP/CORBANA/EARTH/CATIE. Abstracts: 2nd International Workshop on *Mycosphaerella fijiensis* leaf spot diseases of bananas, INIBAP, 2002, pp. 1 y ss.
- [14] Sádaba, B., García-Quetgals, E., Azanza, J., Relación entre Estructura y Función de los Azoles. Revista Española de Quimioterapia, vol. 17, no. 1, 2004, pp. 71-78.
- [15] Vanden-Bossche, H., Mechanisms of Antifungal Resistance. Revista Iberoamericana de Micología, no14, 1997, pp. 44-49.