

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**

**DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE
HONGOS ASOCIADOS A LA SINTOMATOLOGÍA DE LA MUERTE
DE CORONA EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria x ananassa*) EN
CONDICIONES *IN VITRO***

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Artículo Científico para optar por
el grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

Estudiante

Bach. Brenda Elizondo Sibaja

Tutor

M.Sc. José Alonso Calvo Araya

Campus Omar Dengo

Heredia, 2024

Determinación de la sensibilidad a fungicidas de hongos asociados a la sintomatología de la muerte de corona en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) en condiciones *in vitro*.

Estudiante:

Bach. Brenda Elizondo Sibaja

Trabajo final de graduación modalidad artículo científico sometido a consideración del tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**Trabajo final de Graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Ingeniería en Agronomía**

Tribunal Examinador

M.Sc Johaner Rosales Flores

Representante Decanato Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

M. Sc. Andrés Alpízar Naranjo

Director de la Escuela de Ciencias Agrarias

M. Sc. José Alonso Calvo Araya

Tutor del Trabajo Final de Graduación

Bach. Brenda Elizondo Sibaja

Sustentante

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía que me permitió seguir adelante y me dio fuerzas para concluir esta etapa.

A mis padres, Nelson Elizondo y Matilde Sibaja por guiarme en el camino del estudio y brindarme su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Profundo agradecimiento a mi tutor, M.Sc. José Alonso Calvo Araya, por su dedicación, profesionalismo y guía para que esta investigación se llevará a cabo con éxito y pudiera concluir con éxito mi trabajo final de graduación.

A mis compañeros de la carrera de agronomía por sus consejos y acompañamiento a lo largo de mi camino por la Universidad en especial a Yaritza Mata por su apoyo incondicional.

A los profesores que me ayudaron y apoyaron durante el desarrollo de mi trabajo.

A todos los amigos que hice durante mi desarrollo como profesional en la Universidad que de alguna u otra manera me mostraron su apoyo.

¡Gracias!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	10
OBJETIVOS	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos	15
RESUMEN	16
INTRODUCCIÓN	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Sitio de muestreo y localización del estudio	19
Aislamiento de fitopatógenos.....	19
Obtención de cultivos axénicos	21
Identificación y caracterización morfológica.....	21
Sensibilidad a fungicidas	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Aislados obtenidos.....	24
Sensibilidad a fungicidas	27
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción de la finca muestreada.....	19
Tabla 2.	Comparación de medias de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%PIC) de aislados de <i>B. cinerea</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp. colectados de Vásquez de Coronado, San José, Costa Rica, expuestos a metil tiofanato, oxiclورو de cobre y fosetyl-Al.....	28
Tabla 3.	Análisis de la varianza de los resultados obtenidos.	30
Tabla 4.	Análisis de porcentajes de inhibición según fungicida y patógeno.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de desinfección de las muestras de tejido vegetal.	20
Figura 2. Proceso de aislamiento de fitopatógenos de tejido vegetal.....	21
Figura 3. Método del PDA envenenado.....	23
Figura 4. Lesión en corona.....	24
Figura 5. Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> en medio de cultivo PDA	25
Figura 6. Aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. en medio de cultivo PDA.	26
Figura 7. Aislamiento de <i>Pestalotiopsis</i> sp. en medio de cultivo PDA.	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Fungicida utilizado como tratamiento Metil Tiofanato	41
Anexo 2.	Fungicida utilizado como tratamiento Oxicloruro de Cobre	41
Anexo 3.	Fungicida utilizado como tratamiento Fosetyl Al.....	42
Anexo 4.	Análisis estadístico	43

RESUMEN

El cultivo de fresa (*Fragaria ananassa* D) en Costa Rica la fresa, representa una fuente de ingresos principalmente en zonas altas del país, donde se produce un desarrollo agrícola y económico producto de este cultivo. La producción en los últimos años se ha visto mermada por la presencia de diferentes plagas y enfermedades; entre ellas pudriciones de raíces, marchitamientos vasculares y pudrición de la corona de la fresa, la cual se caracteriza por síntomas de decaimiento acompañado de un amarillamiento y posterior necrosis de la corona. Para la realización del presente trabajo se muestreo la Finca el Fresal ubicada en el cantón de Vázquez Coronado 9°97'90,5"N83°98'81,7"W" en la provincia de San José que se dedica al cultivo de fresa, cuya altitud es de 1690 msnm. El aislamiento, identificación y evaluación de la sensibilidad a fungicidas de los patógenos aislados se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional.

Se lograron aislar tres patógenos de la corona de fresa: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp. y *Pestalotiopsis* sp., estos hongos fueron identificados con base en la morfología de su colonia, crecimiento de micelio y las características de sus estructuras reproductivas las cuales fueron idénticas a las reportadas para los hongos mencionados.

Los estudios sobre la sensibilidad del patógeno a fungicidas son de suma importancia, ya que no existen en el país por tratarse de una enfermedad nueva y emergente. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* mediante la técnica del cultivo envenenado de tres patógenos aislados de la corona de fresa mencionados con anterioridad a tres dosis (0.1; 1.0 y 10 ppm) de los fungicidas: metil tiofanato (Código FRAC1, Grupo químico tiofanato), oxiclóruto de cobre (Código FRACM01, Grupo químico M), fosetyl-Al (Código FRACP07, Grupo químico etil fosfonato) utilizados comúnmente en el cultivo de fresa para el control de enfermedades.

Los fungicidas utilizados resultaron altamente fungitoxicos a todos los aislados, destacándose metil tiofanato para el control de *Colletotrichum* sp. como el que

obtuvo un mayor porcentaje (89.16%) de inhibición del crecimiento micelial (PIC). Los demás fungicidas tuvieron valores mayores a un 70% de PIC para los tres hongos fitopatógenos a excepción de metil tiofanato al ser evaluado sobre *B. cinerea* solamente logró un 69.46 de PIC. No hubo variabilidad ni diferencias estadísticamente entre las diferentes dosis de los fungicidas evaluados. Los resultados obtenidos determinan que los fungicidas evaluados logran inhibir el crecimiento de los patógenos evaluados en condiciones *in vitro*.

ABSTRACT

In Costa Rica, the strawberry crop (*Fragaria ananassa* D) represents a source for income mainly in highland areas of the country, where there is an agricultural and economic development as a result of this fruit. Production in recent years has been affected by the presence of different pests and diseases, including root rot, vascular wilt and strawberry crown rot, which is characterized by symptoms of decay accompanied by yellowing and subsequent necrosis of the crown. For the present work, the Finca El Fresal located in the canton of Vázquez Coronado 9°97'90.5 "N83°98'81.7 "W" in the province of San José, which is dedicated to strawberry cultivation, at an altitude of 1690 meters above sea level, was sampled. The isolation, identification and evaluation of the sensitivity to fungicides of the isolated pathogens was carried out at the Phytopathology Laboratory of the School of Agricultural Sciences, Universidad Nacional.

Three strawberry crown pathogens were isolated: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* sp. and *Pestalotiopsis* sp. These fungi were identified based on their colony morphology, mycelial growth and the characteristics of their reproductive structures, which were identical to those reported for the fungi mentioned.

Studies on the sensitivity of the pathogen to fungicides are of utmost importance, since they do not exist in the country because it is a new and emerging disease. The in vitro sensitivity of three pathogens isolated from strawberry crown mentioned above to three doses (0.1; 1.0 and 10 ppm) of the fungicides: methyl thiophanate (Code FRAC1, chemical group thiophanate), copper oxychloride (Code FRACM01, chemical group M), fosetyl-Al (Code FRACP07, chemical group ethyl phosphonate) commonly used in strawberry crop for disease control was evaluated using the poisoned culture technique.

The fungicides used were highly fungitoxic to all isolates, highlighting methyl thiophanate for the control of *Colletotrichum* sp. as the one that obtained the highest percentage (89.16%) of mycelial growth inhibition (PIRG). The other fungicides had values higher than 70% of PIRG for the three phytopathogenic fungi except for methyl thiophanate when evaluated on *B. cinerea*, which only obtained a 69.46%

PIRG. There was no variability or statistical differences between the different doses of the fungicides evaluated. These results obtained determine that the fungicides evaluated were able to inhibit the growth of the pathogens evaluated under *in vitro* conditions.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fresa (*Fragaria x ananassa* D.) es un cultivo de gran importancia que se cultiva en todo el mundo. Actualmente se reporta que los frutos de fresa son una fuente rica en fibra, vitaminas y antioxidantes (National KIDNEY Foundation, 2022). En Costa Rica, se cultiva en zonas como Fraijanes de Poás, San José de la Montaña, San Isidro de Coronado y San Ramón de Tres Ríos, con aproximadamente 335 fincas y 232 hectáreas (ha) dedicadas a la producción (Ministerio de Agricultura y Ganadería, s.f.; INEC, 2014). El principal productor mundial y exportador de fresa es China con una producción de más de 3.3 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos, España y México (FAOSTAT, 2024).

El cultivo de esta fruta enfrenta desafíos, especialmente los causados por enfermedades fúngicas como la muerte de corona, que puede causar pérdidas significativas (Mariscal-Amaro et al., 2017). Esta enfermedad se manifiesta con síntomas como decoloración y muerte gradual de la corona de las plantas (Hidrobo-Chavez et al., 2022). La persistencia de los hongos causantes en el suelo dificulta su control (Muscolino, 2021). Granados-Montero et al. (2022) identificaron hongos asociados con la muerte de corona y sugieren la necesidad de investigaciones adicionales. Los fungicidas más utilizados para el control son metil tiofanato, oxiclورو de cobre y fosetyl-Al para el control de enfermedades fúngicas en fresa.

En México, esta enfermedad causada por hongos pertenecientes a la familia Pestalotiopsisaceae puede causar pérdidas entre 40 a 50% y han existido reportes en México y USA (Acosta-González 2022)

El manejo de la enfermedad incluye medidas preventivas como la rotación de cultivos y el uso de variedades resistentes, así como el uso de fungicidas y biocontroladores. Sin embargo, el uso excesivo de fungicidas puede plantear riesgos para la salud humana y generar resistencia en los patógenos (Loeza, 2018; Hidrobo, 2020). Por lo tanto, es crucial investigar alternativas para el control eficaz y seguro de la muerte de corona en fresas.

Este trabajo busco estudiar la sensibilidad *in vitro* de aislados de tres hongos frente a fungicidas comúnmente usados en fresa, caracterizar micro morfológicamente cada uno de esos aislados, comprobar si existió variabilidad entre aislados a diferentes dosis de las moléculas químicas evaluadas.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la sensibilidad a fungicidas de hongos asociados a la muerte de la corona en el cultivo de fresa, mediante pruebas *in vitro* para la determinación de posible desarrollo de resistencia a estos biocidas.

Objetivos Específicos

- Aislar e identificar morfológicamente los hongos fitopatógenos asociados a la sintomatología de la muerte de la corona en plantas de fresa.
- Realizar pruebas *in vitro* para determinar la sensibilidad a los fungicidas contra los patógenos asociados a la muerte de corona en fresa.

Determinación de la sensibilidad a fungicidas de hongos asociados a la sintomatología de la muerte de corona en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) en condiciones *in vitro*¹

Bach. Brenda Elizondo Sibaja², José Alonso Calvo Araya³

RESUMEN

La actividad de producción de fresa en Costa Rica es una demanda creciente de producción de frutas de calidad y fuente alternativa de ingresos. Los estudios sobre la sensibilidad del patógeno a fungicidas son de suma importancia, ya que no existen en el país por tratarse de una enfermedad nueva y emergente. El objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad a fungicidas de hongos asociados a la muerte de la corona en el cultivo de fresa, mediante pruebas *in vitro* para la determinación de posible desarrollo de resistencia a estos biocidas. El trabajo se llevó a cabo en la Finca el Fresal ubicada en el cantón de Vázquez Coronado 9°97'90,5"N83°98'81,7"W" en la provincia de San José que se dedica al cultivo de fresa, cuya altitud es de 1690 msnm. El aislamiento, identificación y evaluación de la sensibilidad a fungicidas de los patógenos aislados se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional. Los fungicidas utilizados resultaron altamente fungitoxicos a todos los aislados, destacándose metil tiofanato para el control de *Colletotrichum* sp. como el que obtuvo un mayor porcentaje (89.16%) de inhibición del crecimiento micelial (PIC). Los demás fungicidas tuvieron valores mayores a un 70% de PIC para los tres hongos fitopatógenos a excepción de metil tiofanato al ser evaluado sobre *B. cinerea* solamente logró un 69.46 de PIC. No hubo variabilidad ni diferencias estadísticamente entre las diferentes dosis de los fungicidas evaluados. Los resultados obtenidos determinan que los fungicidas evaluados logran inhibir el crecimiento de los patógenos evaluados en condiciones *in vitro*.

Palabras clave: fresa, hongos, fungicidas, sensibilidad, inhibición, *in vitro*, patógenos.

ABSTRACT

The strawberry production activity in Costa Rica is a growing demand for quality fruit production and an alternative source of income. Studies on the sensitivity of the pathogen to fungicides are of utmost importance, since they do not exist in the country because it is a new and emerging disease. The objective of the present study was to evaluate the sensitivity to fungicides of fungi associated with crown death in strawberry crops, through *in vitro* tests to determine the possible development of resistance to these biocides. The work was carried out at the Finca El Fresal located at the Canton of Vázquez Coronado 9°97'90.5"N83°98'81.7"W" in the province of San José, which is dedicated to strawberry crop, whose altitude is 1690 meters above sea level. The isolation, identification and evaluation of the sensitivity to fungicides of the isolated pathogens was carried out in the Phytopathology Laboratory of the School of Agrarian Sciences, National University. The fungicides used were highly fungitoxic to all isolates, with methyl thiophanate standing out for the control of *Colletotrichum* sp. as the one that obtained the highest percentage (89.16%) of inhibition of mycelial growth (PIC). The other fungicides had values greater than 70% PIC for the three phytopathogenic fungi, except for methyl thiophanate, when evaluated on *B. cinerea*, it only achieved a PIC of 69.46. There was no variability or statistical differences between the different doses of the fungicides evaluated. The results obtained determine that the evaluated fungicides manage to inhibit the growth of the pathogens evaluated under *in vitro* conditions.

Key words: strawberry, fungi, fungicides, sensitivity, inhibition, *in vitro*, pathogens.

¹ Este fue el trabajo final de graduación del primer autor en la Universidad Nacional.

² Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Agrarias. Heredia, Costa Rica.
brenda.elizondo.sibaja@est.una.ac.cr

³ Laboratorio de Fitopatología, Escuela de Ciencias Agrarias. Heredia, Costa Rica.
alonso.calvo.araya@una.ac.cr

INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es un cultivo de gran importancia que se cultiva en todo el mundo. Actualmente se reporta que los frutos de fresa son una fuente rica en fibra, vitaminas y antioxidantes (National KIDNEY Foundation, 2022). En Costa Rica, se cultiva en zonas como Fraijanes de Poás, San José de la Montaña, San Isidro de Coronado y San Ramón de Tres Ríos, con aproximadamente 335 fincas y 232 hectáreas (ha) dedicadas a la producción (Ministerio de Agricultura y Ganadería, s.f.; INEC, 2014). El principal productor mundial y exportador de fresa es China con una producción de más de 3.3 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos, España y México (FAOSTAT, 2024).

El cultivo de esta fruta enfrenta desafíos, especialmente los causados por enfermedades fúngicas como la muerte de corona, que puede causar pérdidas significativas (Mariscal-Amaro et al., 2017). Esta enfermedad se manifiesta con síntomas como decoloración y muerte gradual de la corona de las plantas (Hidrobo-Chavez et al., 2022). La persistencia de los hongos causantes en el suelo dificulta su control (Muscolino, 2021). Granados-Montero et al. (2022) identificaron hongos asociados con la muerte de corona y sugieren la necesidad de investigaciones adicionales. Los fungicidas más utilizados para el control son metil tiofanato, oxiclورو de cobre y fosetyl-Al para el control de enfermedades fúngicas en fresa.

En México, esta enfermedad causada por hongos pertenecientes a la familia Pestalotiopsisaceae puede causar pérdidas entre 40 a 50% y han existido reportes en México y USA (Acosta-González 2022)

El manejo de la enfermedad incluye medidas preventivas como la rotación de cultivos y el uso de variedades resistentes, así como el uso de fungicidas y biocontroladores. Sin embargo, el uso excesivo de fungicidas puede plantear riesgos para la salud humana y generar resistencia en los patógenos (Loeza, 2018; Hidrobo, 2020). Por lo tanto, es crucial investigar alternativas para el control eficaz y seguro de la muerte de corona en fresas.

Este trabajo busca estudiar la sensibilidad *in vitro* de aislados de tres hongos frente a fungicidas comúnmente usados en fresa, caracterizar micro morfológicamente

cada uno de esos aislados, comprobar si existió variabilidad entre aislados a diferentes dosis de las moléculas químicas evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y localización del estudio

Las muestras fueron recolectadas de la Finca El Fresal ubicada en el cantón de Vázquez Coronado en la provincia de San José, Costa Rica que se dedica al cultivo de fresa (Tabla 1)

Tabla 1. Descripción de la finca muestreada.

Localidad	Cantón	Precipitación media anual (mm)*	Temperatura media anual (°C)*	Coordenadas
San Rafael	Vázquez Coronado	129.9	16 .70	9.97880; -83.98805

***Fuente:** Modificado de Instituto Meteorológico Nacional (IMN), 2020.

La parte experimental de la investigación se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional.

Aislamiento de fitopatógenos

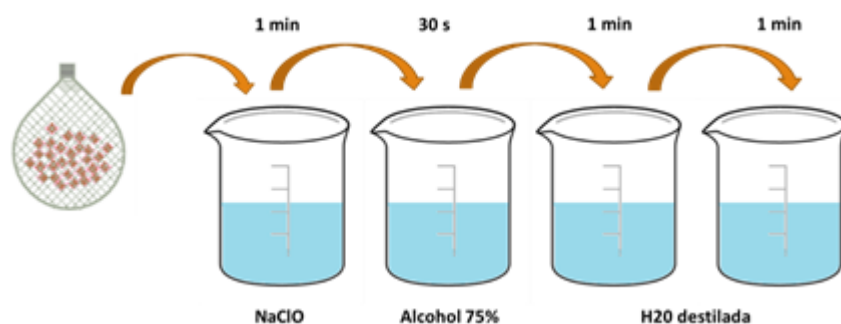
Una vez en el laboratorio, las plantas muestreadas serán identificadas según lote y fecha de recolección dicha clasificación se utilizó a lo largo de la investigación. Seguidamente, las plantas se lavaron con agua potable para eliminar algún residuo, tierra y los remanentes de materia orgánica. Después se tomaron fotografías de cada una de las partes de la planta con el fin de asociar los síntomas observados con los posibles patógenos que se aíslan según los aspectos que se detallan a continuación:

- Corona: se realizarán cortes transversales y longitudinales para observar necrosis, posibles lesiones, forma de estas, lesiones de apariencia acuosa, color, olor, entre otros.

Los aislamientos se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar, se hicieron cortes de 1,0 x 1,0 cm que incluyó la línea de avance de la lesión, también se hará un registro fotográfico de los síntomas observados; el material restante se almacena en el refrigerador del laboratorio, dentro de bolsas plásticas limpias a 16°C durante un mes.

Los trozos de material vegetal clasificados se colocaron dentro de una gasa formando una bolsita para desinfectarlos, este procedimiento se realizó dentro de la cámara de transferencia, bajo condiciones asépticas. Para esto, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5% de ingrediente activo, durante 60 segundos posteriormente, los segmentos de material vegetal se sacaron de la bolsita y se colocaron en alcohol al 75% durante 30 segundos y, por último, se hicieron dos lavados con agua destilada estéril por un minuto en agitación manual; lo anterior con el objetivo de eliminar residuos de desinfectante en la muestra vegetal, como se observa en la Figura 1.

Figura 1. Proceso de desinfección de las muestras de tejido vegetal.

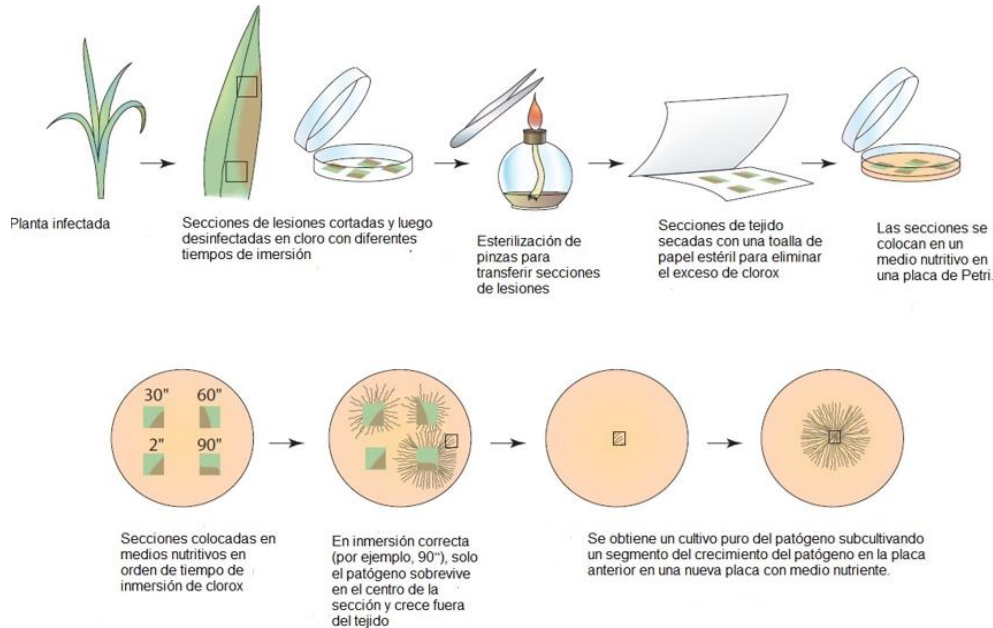


Fuente: Elaboración propia

Finalizado el proceso de desinfección, se tomaron secciones de 1,0 x 1,0 mm de tejido vegetal para ser colocados en platos Petri con 15 ml con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) acidificado que permitirá aislar hongos en general. Todos

los platos Petri se sellarán utilizando Parafilm y se colocarán en incubación, en oscuridad, a 24°C (Figura 2).

Figura 2. Proceso de aislamiento de fitopatógenos de tejido vegetal.



Fuente: Agrios (2005).

Obtención de cultivos axénicos

Los platos Petri en incubación se revisaron al microscopio luego de 24 horas. Este primer filtro se realizará con el fin de separar y transferir los microorganismos que crecen en un mismo plato.

Para el caso de los hongos, se transfirieron aquellos platos donde se identificaron células conidiogénicas. Este procedimiento se realizó tomando cada hifa con una aguja de disección estéril para luego colocarlo en un nuevo plato de medio de cultivo.

Identificación y caracterización morfológica

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos, se procedió con la identificación taxonómica. Los hongos fueron identificados con base en la morfología de su colonia, crecimiento de micelio y las características de sus estructuras reproductivas como: forma, color, estriación, septación, tamaño, células conidiogénicas, de acuerdo con claves dicotómicas (Gallegly & Hong, 2008;

Watanabe,2018; Barnett y Hunter, 1998).Para esto, se procedió a hacer preparados fijos, tomando porciones de micelio y esporas de los aislamientos, los cuales se colocaron en portaobjetos y se les añadió una gota de azul de lactofenol para ser observados al microscopio y determinar la presencia de características diagnósticas.

Sensibilidad a fungicidas

Para el análisis de la determinación de la sensibilidad a los fungicidas se seleccionó un aislado de cada hongo fitopatógeno aislado. La selección se realizó de acuerdo con sus reportes en la literatura por grado de afectación y asociatividad a la enfermedad. Para evaluar la sensibilidad se utilizó la técnica de cultivo envenedado descrita por Dhingra y Sinclair (1995).

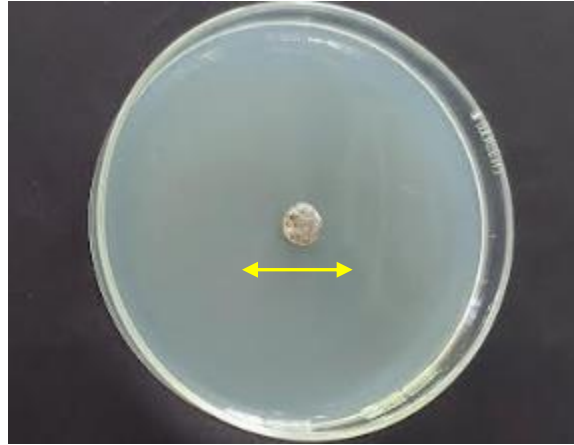
Se evaluó la sensibilidad de los tres patógenos aislados de la corona de fresa mencionados con anterioridad a tres dosis (0.1; 1.0 y 10 ppm) de los fungicidas: metil tiofanato (Código FRAC1, Grupo químico tiofanato), oxiclورو de cobre (Código FRACM01, Grupo químico M), fosetyl-AI (Código FRACP07, Grupo químico etil fosfonato) utilizados comúnmente en el cultivo de fresa para el control de enfermedades.

Para preparar el medio de cultivo envenedado se utilizó PDA, fungicida, un Erlenmeyer de 100 ml, tubo de ensayo, caja Petri, pipeta de 1.0 ml, inoculador, agua destilada estéril. Para el procedimiento, se prepararon 49,5 ml del medio de cultivo (PDA) en el Erlenmeyer, posteriormente se agregó 1.0 ml de fungicida en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril. Para las soluciones de los fungicidas a evaluar, se agregarán 0.5 ml de esta solución a los 49,5 ml de PDA que se encontraban a una temperatura de 40-50°C que se mezclaron en agitación constante, posteriormente se agregaron 50 ml de PDA que contenían la solución del fungicida en 4 cajas Petri (Sagayama y Dardón 2001).

Una vez preparados los medios de cultivo con los fungicidas en las diferentes dosis, se sacaron discos de 5.0 mm de diámetro conteniendo micelio de los aislados de siete días de crecimiento de cada uno de los hongos cultivados en PDA, se colocaron en el centro de las cajas Petri (Figura 3) que contenían las diferentes

concentraciones. Cada 24h después de la incubación oscuridad a 26°C, se midió el crecimiento de la colonia en dos direcciones perpendiculares hasta que el hongo en el control (PDA sin fungicida).

Figura 3. Método del PDA envenenado.



Fuente. Elaboración propia.

Los datos obtenidos al final de la medición fueron utilizados para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) de cada aislado por medio de la fórmula.

$$\text{Inhibición de crecimiento en porcentaje (\%)} = (1-B/A) \times 100$$

Donde: A= Diámetro de la colonia de hifas en mm sin aplicar y B= Diámetro de la colonia de hifas en mm con aplicación.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño factorial (factor A: aislados de hongos y factor B, concentraciones de fungicidas) con arreglo combinatorio y distribución completamente al azar. Para cada concentración de fungicida se emplearon cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri con cuatro colonias monospóricas para un total de 9 tratamientos con 3 dosis distintas y el testigo absoluto sin aplicación de fungicida (solo PDA). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 0,05 de probabilidad, empleando el software R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislados obtenidos

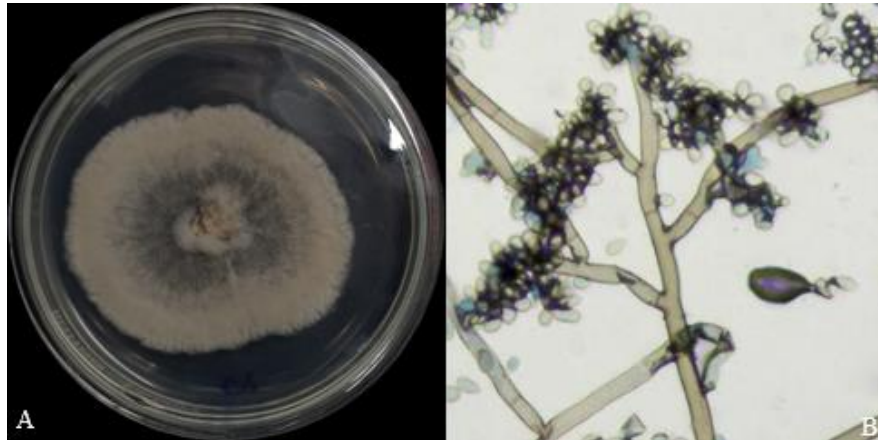
Se lograron obtener diferentes aislados de tres hongos fitopatógenos: *B. cinera*, *Colletotrichum* sp. y *Pestalotiopsis* sp. Cada uno de los aislamientos desarrollaron crecimiento y desarrollo de micelio de acuerdo con las características diagnósticas reportadas (Figura 4). En todos los aislamientos se determinó la presencia de micelio septado y producción de conidios (esporas asexuales).

Figura 4. Lesión en corona.



Para el primer aislamiento se identificó como *Botrytis cinerea* debido a su textura y coloración, además de sus estructuras observadas en microscopio tal como menciona Xue *et al.* (2018). Este hongo está compuesto por hifas septadas y ramificadas con conidios comúnmente en forma esférica u ovals, exhibe un micelio denso y algodonoso que varía de blanco a grisáceo, particularmente cuando produce esporas (Figura 5) (Segundo, Rocha y Barboza, 2015).

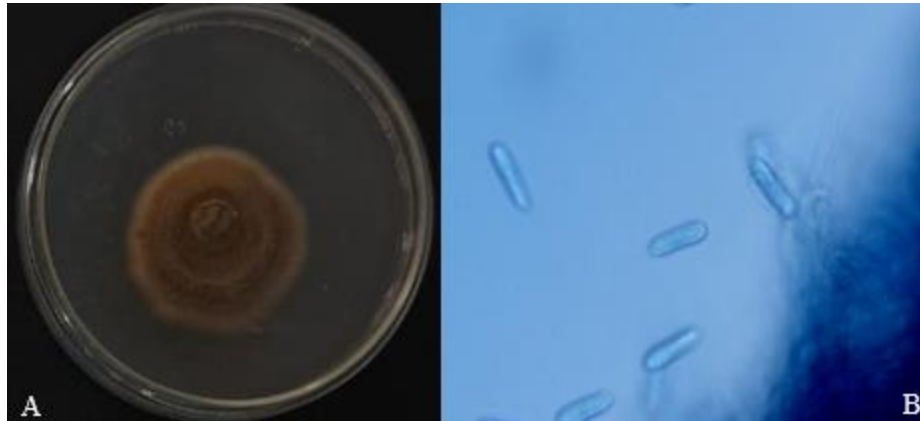
Figura 5. Aislamiento de *Botrytis cinerea* en medio de cultivo PDA



Nota: (A) Crecimiento de cultivo puro de *B. cinerea* aislado de coronas de fresa
(B) Hifas septadas, conidios y conidióforos.

Colletotrichum sp fue otro de los patógenos obtenidos por medio del aislamiento. Este incluye varias especies fitogenéticas importantes que causan enfermedades de amplia gama, entre algunas características existe presencias de estructuras especializadas llamadas acérvulos que contienen conidios los cuales son sumamente importantes para la dispersión e infección (O'Connell et al., 2012). Según Damm et al., (2019). Dichas colonias inicialmente son blancas y conforme sus días de crecimiento se tornan de color café, característica presente en la colonia utilizada (Figura 6). Por otro lado, la especie utilizada se caracterizó por un crecimiento lento, lo cual es común en algunas especies (Baroncelli et al., 2015).

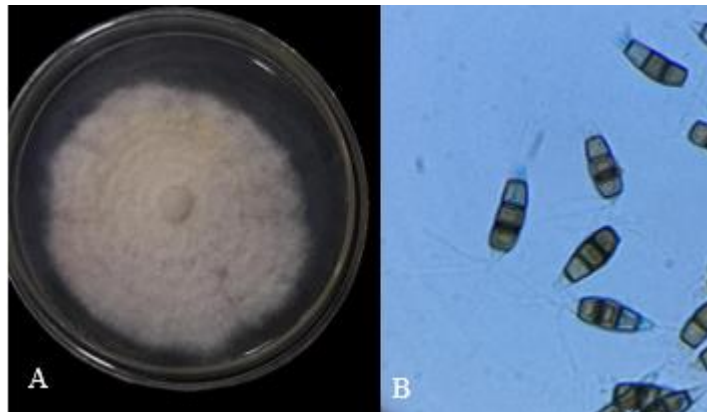
Figura 6. Aislamiento de *Colletotrichum* sp. en medio de cultivo PDA.



Nota: (A) Crecimiento de cultivo puro de *Colletotrichum* sp. aislado de coronas de fresa (B) Ameroconidios de *Colletotrichum* sp.

El último patógeno se caracteriza por los conidios que forma, debido a que presentan 3 apéndices (Figura 7) mismos que son la clave de su identificación además estos presentan colores oscuros y son septados (Uriel, 2022). Como parte de las características apreciadas visualmente, está formado por un micelio blanco, algodonosos que con el avance de los días se puede tornar amarillento, por esta y todas las características anteriormente descritas lleva a la correcta identificación la cual corresponde a *Pestalotiopsis*. Granados-Montero et al. (2022), describe a *Pestalotiopsis* como un hongo patógeno en el cultivo de fresa el cual presenta en medio de cultivo un crecimiento blanquecino y fragmoconidios.

Figura 7. Aislamiento de *Pestalotiopsis* sp. en medio de cultivo PDA.



Nota: (A) Crecimiento de cultivo puro de *Pestalotiopsis* sp. aislado de coronas de fresa (B) fragmoconidios con 3 apéndices de *Pestalotiopsis* sp.

Sensibilidad a fungicidas

El efecto inhibitorio de los fungicidas metil tiofanato, oxiclóruo de cobre y fosetyl-Al sobre el el crecimiento de las colonias y porcentaje de inhibición de los aislados de *B. cinerea*, *Colletotrichum* y *Pestalotiopsis* entre tratamientos y dosis no resultó significativo ($P>0.05$). No se detectaron aislamientos resistentes a los fungicidas evaluados en las dosis empleadas (Tabla 2).

Los valores del efecto de metil tiofanato en la inhibición del crecimiento de *B. cinérea* oscilaron entre 69.3 y 70.1% con respecto al testigo, para *Colletotrichum* entre 87.7 y 89.8% (Tabla 2).

Con respecto a la inhibición del crecimiento de *Pestalotiopsis* los valores estuvieron entre 75.4 y 82.5% (Tabla 2).

Al analizar el control in vitro del oxiclóruo de cobre sobre *B. cinerea* oscilaron entre 52.6 y 73.5% con respecto al testigo, para *Colletotrichum* entre 87.8 y 89.8% y para *Pestalotiopsis* entre 76.1 y 79.4% (Tabla 2).

El fungicida fosetyl-Al, al ser evaluado in vitro logro una reducción del crecimiento de *B. cinerea* entre un 55.2% y 59.4; mientras que para *Colletotrichum* un promedio de 87.7 para las tres dosis evaluadas y logró inhibir entre un 70.3 y 79.1% el crecimiento de *Pestalotiopsis* (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de medias de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%PIC) de aislados de *B. cinerea*, *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. colectados de Vásquez de Coronado, San José, Costa Rica, expuestos a metil tiofanato, oxiclورو de cobre y fosetyl-Al.

Hongo	metil tiofanato		oxiclورو de cobre		fosetyl-Al.	
	Dosis (ppm)	Inhibición (%)	Dosis (ppm)	Inhibición (%)	Dosis (ppm)	Inhibición (%)
<i>B. cinerea</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>B. cinerea</i>	0.1	70.1	0.1	63.1	0.1	59.4
<i>B. cinerea</i>	1.0	69.1	1.0	52.6	1.0	55.4
<i>B. cinerea</i>	10	69.3	10	73.5	10	55.2
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Colletotrichum</i> sp.	0.1	87.8	0.1	87.8	0.1	87.7
<i>Colletotrichum</i> sp.	1.0	89.8	1.0	89.8	1.0	87.7
<i>Colletotrichum</i> sp.	10	88.7	10	88.7	10	87.7
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.1	75.8	0.1	79.4	0.1	70.3
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1.0	75.4	1.0	76.1	1.0	73.0
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	10	82.5	10	78.8	10	79.1

En respuesta a las pruebas de inhibición realizadas, se presentan los valores de las interacciones en la tabla 3. Lo que concierne con respecto al p-valor no existieron diferencias significativas para las interacciones de Fungicida-dosis, Patógeno-Dosis ni en el caso de fungicida-patógeno-dosis según el análisis de la varianza que dieron como resultados ($p>0,05$) en los diferentes casos, a diferencia de la relación fungicida-patógeno que presenta diferencia significativa ($p<0,05$) en este caso (0.023) que indica que si existe una interacción entre estas dos variables, lo anterior da a conocer que la respuesta del fungicida, depende del patógeno al cual se le es aplicado.

Dicha interacción según algunos estudios puede variar significativamente dependiendo del patógeno al que se aplique, debido a que existen diferentes especies y cepas de patógenos con niveles de resistencia o que persisten en ambientes y prácticas agrícolas que pueden influir la eficacia del fungicida. Por la misma razón se puede obtener un fungicida efectivo para dicho patógeno en determinada región, pero puede disminuir su efecto en otra región debido a la genética e incluso exposición previa a otros fungicidas (Zarate, 2012). Continuando con lo mencionado, existen registros del patógeno *B. cinérea* categorizado con altos niveles de resistencia en diferentes regiones por Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) en 2010 incluyéndolo en la lista de alto riesgo de resistencia a fungicidas, recomendado además emplear estrategias para el manejo de este, debido a que posee diversidad de hospedantes, alta tasa de producción de conidios entre otras que facilitan su crecimiento y que perdure en el cultivo (FRAC, 2024).

Tabla 3. Análisis de la varianza de los resultados obtenidos.

Variables	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p-value
Fungicida	2	15.39	7.69	0.340	0.712
Patógeno	2	5266.37	2633.18	116.406	0.000*
Dosis	2	91.06	45.53	2.012	0.140
Fungicida: Patógeno	4	269.55	67.38	2.979	0.023*
Fungicida: Dosis	4	61.74	15.43	0.682	0.606
Patógeno: Dosis	4	135.59	33.89	1.498	0.210
Fungicida: Patógeno: Dosis	8	83.42	10.42	0.461	0.879

La relación entre la dosis de fungicida y la respuesta de los patógenos no mostró diferencias significativas en este estudio, lo que sugiere que los tratamientos con diferentes dosis no tuvieron efectos discernibles en la inhibición del crecimiento de los tres patógenos evaluados. Estos resultados indican la no presencia de ciertos niveles de resistencia de los patógenos a los fungicidas utilizados, lo que implica que aumentar la dosis del fungicida no conduciría a una disminución significativa en el crecimiento de los mismos Fisher et al., (2022).

Este hallazgo es consistente con la idea de que una vez que un patógeno desarrolla resistencia a un fungicida específico, este puede evadir los efectos del tratamiento independientemente de la dosis aplicada. Sin embargo, es importante destacar que, aunque la dosis más alta no resulte en una inhibición notable del patógeno, aún puede existir algún nivel de control, aunque posiblemente insuficiente para proteger completamente la planta y mantener su productividad óptima. Esta percepción errónea de que una mayor dosis de fungicida tendría un efecto positivo puede ejercer presión de selección sobre el patógeno, lo que potencialmente acelera el desarrollo de resistencia en las poblaciones de patógenos, como se menciona en estudios previos (Carmona y Sautua, 2017)

Mediante el cálculo de la media marginal estimada, se obtuvieron los porcentajes estimados de inhibición de los fungicidas respecto a los tres patógenos analizados. Como se detalla en la Tabla 4, la mayoría de los porcentajes se sitúan en torno al 70%, con la excepción de *Colletotrichum* sp., que exhibe porcentajes de inhibición notablemente altos, alcanzando hasta un 89%. Esto sugiere un control efectivo por parte de los fungicidas evaluados sobre este patógeno en particular. En el contexto de pruebas de sensibilidad de fungicidas frente a patógenos, los porcentajes superiores al 50% se consideran indicativos de una respuesta satisfactoria del fungicida contra el patógeno. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este umbral puede variar según factores como las características específicas del patógeno y la naturaleza del estudio (Bravo, 2015).

Tabla 4. Análisis de porcentajes de inhibición según fungicida y patógeno.

Fungicida	Patógeno	Medias estimadas	Error estándar	df	Límite inferior	Límite superior
Metil tiofanato	<i>B. cinerea</i>	69.46	1.3473	97	66.788	72.137
Oxicloruro- Cu	<i>B. cinerea</i>	71.47	1.3473	97	68.798	74.146
fosetyl-Al	<i>B. cinerea</i>	74.26	1.3473	97	71.594	76.942
Metil tiofanato	<i>Colletotrichum</i> sp.	89.16	1.3473	97	86.492	91.840
Oxicloruro- Cu	<i>Colletotrichum</i> sp.	88.79	1.3473	97	86.122	91.470
fosetyl-Al	<i>Colletotrichum</i> sp.	87.21	1.3473	97	84.543	89.891
Metil tiofanato	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	77.90	1.3473	97	75.233	80.581
Oxicloruro- Cu	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	78.07	1.3473	97	75.399	80.748

Fungicida	Patógeno	Medias estimadas	Error estándar	df	Límite inferior	Límite superior
fosetyl-Al	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	74.12	1.3473	97	71.455	76.803

La Tabla 4 refuerza la diferencia significativa observada en la Tabla 3 al ilustrar cómo el desempeño del fungicida varía según el patógeno evaluado. Se observa que, si bien el fungicida mantiene un rango de efectividad consistente dentro de un mismo patógeno, su interacción con otros patógenos cambia notablemente. Estos hallazgos respaldan la noción presentada en el estudio de Zarate (2012), que resalta la influencia de factores específicos del patógeno en la respuesta a los tratamientos fungicidas.

Se llevaron a cabo pruebas con metil tiofanato, donde se demostró que el crecimiento micelial es especialmente sensible a este compuesto, debido a la afinidad del grupo de benzimidazoles por la proteína β -tubulina, lo que afecta el ensamblaje de microtúbulos y los procesos de formación celular. Sin embargo, se requieren concentraciones más elevadas para lograr un control efectivo de los conidios (Espinoza et al., 2017). En este estudio, el desempeño del metil tiofanato fue positivo, ya que se observaron porcentajes de inhibición satisfactorios para dos de los patógenos evaluados. No obstante, se registró un porcentaje relativamente menor en el caso de *B. cinerea*, lo que concuerda con su notoriedad de poseer niveles más bajos de sensibilidad según la literatura científica (FRAC). Además de esto, un estudio previo realizado en Michoacán, México en 2017 sobre la resistencia de *Botrytis* a fungicidas encontró niveles significativamente elevados de resistencia al metil-tiofanato. Este estudio contrasta notablemente con los resultados obtenidos en nuestro trabajo actual.

En el caso del oxiclورو de cobre (oxicob), estudios previos han demostrado su efecto inhibitorio sobre diversos patógenos, incluyendo *C. gloeosporioides*. Se ha explicado que este compuesto actúa formando complejos que penetran en las células fúngicas, interactuando con proteínas y generando quelatos que desplazan

metales esenciales e iones de hidrógeno del patógeno. Además, su modo de acción de contacto favorece su eficacia (Suarez et al., 2013). Los resultados obtenidos para *Colletotrichum* sp confirman su efectividad, similar a la observada en ensayos anteriores. Además, este modo de acción ha demostrado proporcionar altos porcentajes de inhibición para los tres patógenos evaluados en este estudio. Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas, como la realizada por Moyelema en 2022, que también destacan la efectividad de este compuesto contra una variedad de patógenos.

Guillen et al., (2017) demostró en su estudio que los fungicidas como *benomil*, difenoconazol y captan son efectivos inhibidores del crecimiento de *C acuatum*, alcanzando hasta un 100% de inhibición in vitro. En contraste, el oxiclورو de cobre mostró una inhibición del 62%, aunque sea significativo, es inferior a la observada con los otros fungicidas. Los resultados del presente estudio muestran una inhibición ligeramente menor, con porcentajes de hasta 88% y 78%, respectivamente. Estos hallazgos subrayan la importancia del patógeno en las evaluaciones.

A pesar de lo anteriormente descrito hay un estudio en mora en el 2013, que probó la sensibilidad de *B. cinérea* mostró resultados de tolerancias ya que no registro cambios en crecimiento ni germinación de conidios, sensibilidad que probó con varios fungicidas entre los que se encontraba uno con contenidos de cobre, lo cual en contraste con el análisis de este trabajo no concuerda, pero el modo de acción y el compuesto del fungicida al ser diferente al empleado en las pruebas puede hacer que los resultados varíen así como el patógeno estudiado, esta razón logra recalcar la importancia de hacer una correcta elección del producto para el combate del patógeno presente.

En un estudio mencionado por Bayer en 2014, se demostró que el Fosetil aluminio (Tebefol) controla eficazmente enfermedades causadas por hongos oomycetos, especialmente *Phytophthora*, al reducir el desarrollo del micelio, la germinación y la esporulación, logrando incluso un control del 100% en pruebas realizadas con *P. palmivora* (Bayer, 2014). Sin embargo, los resultados obtenidos

en este estudio fueron diferentes, con porcentajes de inhibición del 74% para *Botrytis cinérea* y *Pestalotiopsis* sp, en contraste con el porcentaje más alto del 87% observado para *Colletotrichum* sp. Es importante destacar que las disparidades en los porcentajes pueden atribuirse a la diversidad de patógenos evaluados en ambos estudios, así como a las diferencias en las dosis aplicadas, que en ese estudio alcanzaron hasta 1000 ppm. Además, se debe considerar que la resistencia podría desarrollarse con el tiempo debido a una aplicación inadecuada del fungicida

Recientemente, se llevaron a cabo evaluaciones de sensibilidad para *Neopestalotiopsis* utilizando diversos fungicidas, analizando su efectividad en relación con su modo de acción y diferentes dosis, que abarcaron desde 0.05 hasta 1000 ppm. Los resultados revelaron que *Neopestalotiopsis* presentó una baja tasa de crecimiento con fludioxonil a una dosis de 10 ppm, y se observó una mayor eficacia de los principios activos sistémicos y de contacto en términos de inhibición (Moyelema, 2022). Sin embargo, a diferencia del estudio de Moyelema, las pruebas realizadas con *Pestalotiopsis* no mostraron diferencias significativas entre las dosis aplicadas, lo que impide recomendar un fungicida específico. No obstante, se puede concluir que los tres fungicidas evaluados presentaron buenos porcentajes de inhibición frente a este patógeno.

Es habitual que los porcentajes de inhibición observados en las pruebas in vitro no se traduzcan directamente en la misma eficacia en condiciones de campo. De hecho, algunos estudios han señalado que esta eficacia puede disminuir hasta en un 20% en los casos más desfavorables, lo cual está estrechamente relacionado con factores ambientales externos (Tran et al., 2012). Por consiguiente, aunque los tres fungicidas evaluados mostraron buenos porcentajes de inhibición, su efectividad en el campo está influenciada por una serie de variables que pueden modificar la efectividad real del control en situaciones prácticas.

CONCLUSIONES

Los resultados de las pruebas de inhibición mostraron interacciones significativas entre fungicidas y patógenos estudiados. Destacó que en general los porcentajes de inhibición fueron mayores del 50%, lo que sugiere una respuesta efectiva en condiciones *in vitro*.

No hubo diferencias significativas entre dosis de fungicida lo que sugiere que los patógenos pueden presentar ciertos niveles de resistencia a los fungicidas evaluado. Esto resalta la importancia de considerar otros factores como la genética del patógeno y la exposición previa a fungicidas, al evaluar la efectividad de los tratamientos, así como también ampliar el rango de dosis como en algunos estudios.

Si bien los porcentajes de inhibición obtenidos en las pruebas fueron alentadores la efectividad de los fungicidas en condiciones de campo, puede estar influenciada por una variedad de factores ambientales y biológicos. Por tanto, es necesario realizar estudios adicionales para evaluar la eficacia de los fungicidas en situaciones de campo y desarrollar estrategia de manejo integrado de enfermedades.

Finalmente, este estudio proporciona información valiosa sobre la identificación de patógenos asociados a la muerte de corona en fresa y la respuesta a estos tratamientos, pero se destaca la importancia de considerar las interacciones en el ambiente agrícola para el control efectivo de las enfermedades fúngicas en campo.

RECOMENDACIONES

Una rotación inteligente de fungicidas con respecto a su clase o modos de acción para prevenir el desarrollo de resistencia, resaltando la importancia de no depender de un solo tipo de fungicida.

Realizar pruebas periódicas de sensibilidad de los patógenos a los fungicidas, lo cual permitiría detectar cambios en la sensibilidad y ajustar de esta manera las estrategias de control.

Uso integrado de prácticas culturales, como eliminación de restos del cultivo para evitar una mayor distribución del patógeno, rotación de cultivos con especies no susceptibles, con la capacidad de reducir la presión del patógeno y limitar la implementación de fungicidas.

Educación y capacitación a productores sobre el uso adecuado de los fungicidas, incluyendo dosis, momentos de aplicación.

Investigación continua, con nuevas opciones de control y métodos alternativos que ayuden a disminuir la dependencia de fungicidas, además de investigar y promover el uso de agentes biológicos para el control de enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-González, U. (2022). *Caracterización de aislamientos de Neopestalotiopsis spp. y efecto de fungicidas en pre y post-infección en el cultivo de fresa*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma Chapingo]. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/ef236028-2016-4924-a261-d0006c1a2754/content>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. (5th ed.). New York, USA.: Academic Press.
- Alvarez, A., Silva, H., Leyva, S., Marbán, N y Rebollar, A. (2017). Resistencia de Botrytis cinérea de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) a fungicidas en Michoacan Mexico. *Agrociencia*, 51(7).
- Barnett H. L.y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*.
- Barnett H. L.y Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19991000964>
- Belén. M. (2019). Estudio de la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Cercospora sojina* Hará, agente causal de la mancha ojo de rana en cultivo de soja. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de San Luis].
- Bianchi P.G. (2018). *Guía completa del cultivo de las fresas con consejos para el cultivo biológico de las fresas para saberlo todo sobre las variedades, la fertilización, el riego, la cosecha y los costos de producción de las fresas*. De Vecchi Ediciones.
- Bravo, J. (2019). Evaluación In vitro de la actividad biocida de diferentes fungicidas sobre el crecimiento radial de *Moniliophthora rorei*, *Moniliophthora perniciosa* y *Phytophthora palmivora*, agentes causales de enfermedades de cacao. [Tesis de Grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo].
- Carmona, M y Sautua F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causa y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía y ambiente* 37(1).
- Dhingra y Sinclair (1995). *Basic plant pathology methods*. Lewis Publishers

- Espinoza, D., Silva, H., Leyva, S., Marbán, N y Rebollar, A. (2017). Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobin. *Revista Mexicana de fitopatología*, 35(2).
- Fisher, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., Berman, J., Bicanic, T., Bignell, E. M., Bowyer, P., Bromley, M., Brüggemann, R., Garber, G., Cornely, O. A., Gurr, S. J., Harrison, T. S., Kuijper, E., Rhodes, J., Sheppard, D. C., Warris, A., White, P. L., Xu, J., Zwaan, B., & Verweij, P. E. (2022). Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature Reviews Microbiology*.
- French y Herbert (1967). *Métodos de investigación Fitopatológica*. IICA.
- Fungicide Resistance Action Committee. (s.f.). FRAC Recommendations for Resistance Management. Recuperado el 28 de junio de 2024, de <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management>
- Gallegly, M & Hong, C. (2008). *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Gallegly, M & Hong, C. (2008). *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Granados-Montero, M., Zúñiga-Castañeda, M., Chaverri-Echandi, P., Escudero-Leyva, E., y Mardones-Hidalgo, M. (2022). Patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa (*Fragaria ananassa*) y descripción ultraestructural del patosistema. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v46i2.52043>
- Guillen, D., Cadenas, C., Alía, I., López, V., Andrade, M & Juárez, P. (2017). In vitro colonial inhibition of an isolate from *Colletotrichum acutatum* Simmonds to fungicide treatments. *Revista centro agrícola*, 44(4).
- Hidrobo Joussy. (2020). *Evaluación morfológica y de patogenicidad del hongo Neopestalotiopsis como agente causal de la pudrición de corona en frutillas (Fragaria x ananassa) variedad Albión* [Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito USFQ].

- Hidrobo-Chavez, J., Ramírez-Villacís, D. X., Barriga-Medina, N., Herrera, K., & León-Reyes, A. (2022). First report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on strawberry in Ecuador. In *Plant Disease* 106(3).
<https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1278-PDN>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2014). *Censo Nacional Agropecuario*.
<https://inec.cr/estadisticas-fuentes/censos/censo-agropecuario-2014>
- Loeza, J. (2018). Manual de producción de fresa en Coalcomán Michoacán. *Tecnológico Nacional de México*.
- Mariscal-Amaro, L. A., Rivera-Yerena, A., Dávalos-González, P. A., y Ávila-Martínez, D. (2017). Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, 51(6).
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (s.f.). *Fragaria* SPP. *Rosaceae*.
<https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-0658fresa.pdf>
- Moyolema, I. (2022). Sensibilidad in vitro de *Neopestalotiopsis* spp. agente cuasal de la pudrición de la corona de frutilla a fungicidas de diferentes modos de acción. [Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
- Muscolino Camila. (2021). *Alternativas para la desinfección del suelo en el cultivo de frutilla (Fragaria x ananassa Dunch) en el Valle Bonarense del Rio Colorado* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Sur].
- National Kidney Foundation. (s.f.). Strawberries: Lo que necesita saber sobre la enfermedad renal. Recuperado el 28 de junio de 2024, de:
https://www.kidney.org/sites/default/files/strawberries_spanish.pdf
- Programa Integral de Mercadeo Agropecuario. (2016). *Análisis del consumo de frutas, hortalizas, pescado y mariscos en los hogares costarricenses*.
<https://www.pima.go.cr/wp-content/uploads/2017/07/Analisis-Consumo.pdf>
- Romero RR and Sutton TB. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana in Costa Rica. *Plant Disease* 82: 931-934.

Sagayama, K y Dardón, D. 2001. Manual de ensayos de eficacia de plaguicidas. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. Guatemala.

Servicio Fitosanitario del Estado. (2023). *SFE Insumos y Fiscalización*.
<https://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Seguridad/Home.aspx>

Singlenton, L.L., Mihail, J.D. and Rush, C.M. 1992. *Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.

Singlenton, L.L., Mihail, J.D. and Rush, C.M. 1992. *Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.

Suarez, M., Mendoza, I., Monroy, A., Cruz, J., Angulo, O y Gonzalez, O. (2013). Aislamiento, identificación y sensibilidad a antifúngicos de hongos fitopatógenos de papaya cv maradol (Carica papata L.) *Revista Iberoamericana de tecnología Postcosecha*, 12(2).

Tran-Dinh, N., & Clement-Metral, J. D. (2012). Sensitivity of Trichoderma spp. isolates from different geographical origins to carboxylic acid amide fungicide: impact on tomato damping-off and development of resistance. *Crop Protection*, 42, 62-68

Watanabe, T. (2018). *Pictorial Atlas of Soilborne Fungal Plant Pathogens and Diseases*. Florida, USA.: CRC Press.

Watanabe, T. (2018). *Pictorial Atlas of Soilborne Fungal Plant Pathogens and Diseases*. Florida, USA.: CRC Press.

Zapata Narváez, J. A., Cotes Prado, A. M., & Uribe Gutiérrez, L. A. (2013). Sensibilidad de *Botrytis cinera* a siete fungicidas comúnmente empleados para su control en cultivos de mora. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA.

Zárate, G. (2012). Análisis de sensibilidad de fungicidas utilizados en el combate de *Botrytis cinerea* *in vitro* en *in vivo* utilizando plántulas de tomate (*solanum lycopersicum*). [Tesis de Grado, Universidad de Costa Rica].

ANEXOS

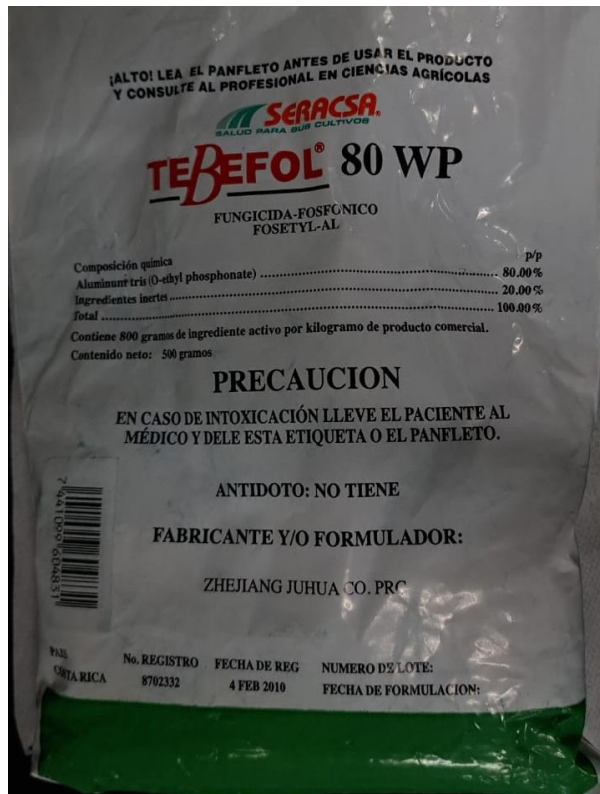
Anexo 1. Fungicida utilizado como tratamiento Metil Tiofanato



Anexo 2. Fungicida utilizado como tratamiento Oxicloruro de Cobre



Anexo 3. Fungicida utilizado como tratamiento Fosetyl Aluminio



Anexo 4. Análisis estadístico

Librerías a utilizar

```
library(readxl)
library(tidyverse)
library(emmeans)
library(multcomp)
library(multcompView)
library(knitr)
```

Incluyendo los datos

```
## Incluyendo Los datos
```

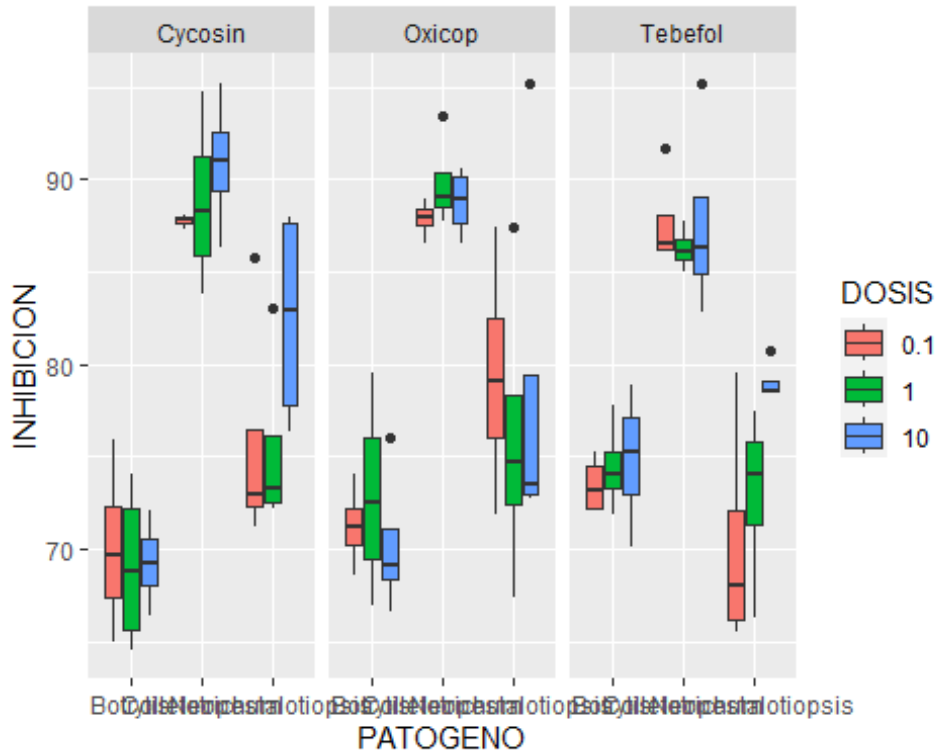
```
data <- read_excel("Base datos TFG.xlsx", sheet = "data",
                  col_types = c("text", "text", "text",
                               "text", "text", "numeric",
                               "numeric", "numeric"))
```

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \alpha_j + \beta_k + (\tau\alpha)_{ij} + \dots + (\tau\alpha\beta)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

$$H_0: \tau_i = 0$$

$$H_1: \tau_i \neq 0$$

```
plot <- ggplot(data) + aes(x = PATOGENO, y = INHIBICION, fill = DOSIS) +
  geom_boxplot() + facet_grid(~FUNGICIDA)
plot
```



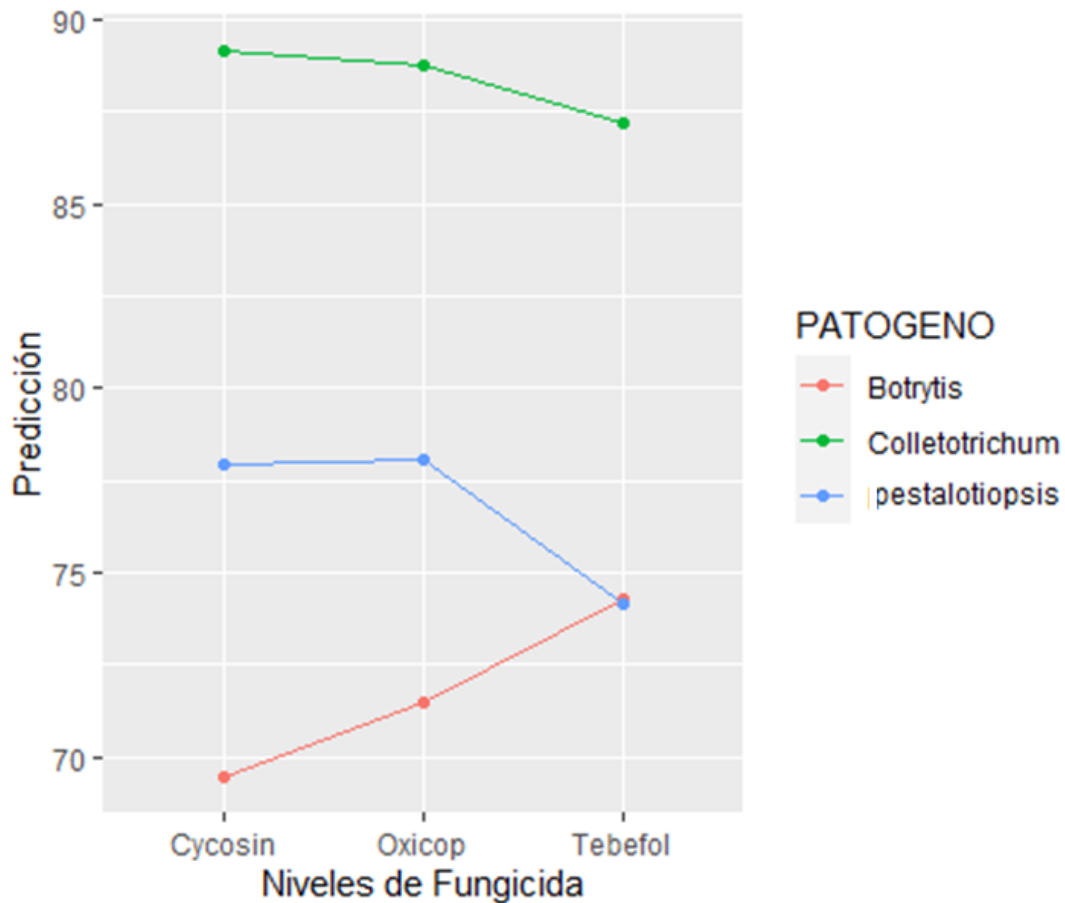
Corriendo un modelo factorial con efecto de interacción

```
mod0 <- lm(INHIBICION ~ FUNGICIDA*PATOGENO*DOSIS, data)
kable(anova(mod0))
```

	D				
	f	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FUNGICIDA	2	15.39272	7.696359	0.3402366	0.7126140
PATOGENO	2	5266.376	2633.1883	116.40660	0.0000000
		60	00	76	0
DOSIS	2	91.06144	45.530721	2.0127983	0.1402429
FUNGICIDA:PATOGENO	4	269.5519	67.387974	2.9790522	0.0238731
FUNGICIDA:DOSIS	4	61.74411	15.436028	0.6823878	0.6061702
PATOGENO:DOSIS	4	135.5909	33.897748	1.4985339	0.2103792
FUNGICIDA:PATOGENO:DOSIS	8	83.42958	10.428698	0.4610264	0.8799154
Residuals	8	1832.269	22.620608	NA	NA
	1	29			

Gráfico de interacción

```
emmip(mod0, PATOGENO ~ FUNGICIDA, xlab = "Niveles de Fungicida", ylab = "Predicción")
```



Comparaciones múltiples para la interacción

```
mult_comp_mod0 <- emmeans(mod0, pairwise ~ FUNGICIDA | PATOGENO)  
kable(mult_comp_mod0$contrasts)
```

contrast	PATOGENO	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Cycosin - Oxycop	Botrytis	- 2.0092593	1.941675	81	- 1.0348072	0.5572151
Cycosin - Tebefol	Botrytis	- 4.8055556	1.941675	81	- 2.4749537	0.0404229
Oxycop - Tebefol	Botrytis	- 2.7962963	1.941675	81	- 1.4401465	0.3253368

contrast	PATOGENO	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Cycosin - Oxicop	Colletotrichum	0.3703704	1.941675	81	0.1907479	0.9801463
Cycosin - Tebefol	Colletotrichum	1.9490741	1.941675	81	1.0038107	0.5766044
Oxicop - Tebefol	Colletotrichum	1.5787037	1.941675	81	0.8130628	0.6960531
Cycosin - Oxicop	Pestalotiopsis	-0.1666667	1.941675	81	-0.0858365	0.9959464
Cycosin - Tebefol	Pestalotiopsis	3.7777778	1.941675	81	1.9456284	0.1326152
Oxicop - Tebefol	Pestalotiopsis	3.9444444	1.941675	81	2.0314649	0.1112085

```
mod1 <- lm(INHIBICION ~ DOSIS + FUNGICIDA * PATOGENO, data)
anova(mod1)
```

```
## Analysis of Variance Table
```

```
##
```

```
## Response: INHIBICION
```

```
##
```

```
##           Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
## DOSIS      2   91.1    45.53    2.0901 0.12921
## FUNGICIDA  2   15.4     7.70    0.3533 0.70326
## PATOGENO   2 5266.4 2633.19 120.8780 < 2e-16 ***
## FUNGICIDA:PATOGENO 4  269.6    67.39    3.0935 0.01919 *
## Residuals 97 2113.0    21.78
```

```
## ---
```

```
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
mult_comp_mod1 <- emmeans(mod1, pairwise ~ FUNGICIDA | PATOGENO)
kable(mult_comp_mod1$contrasts)
```

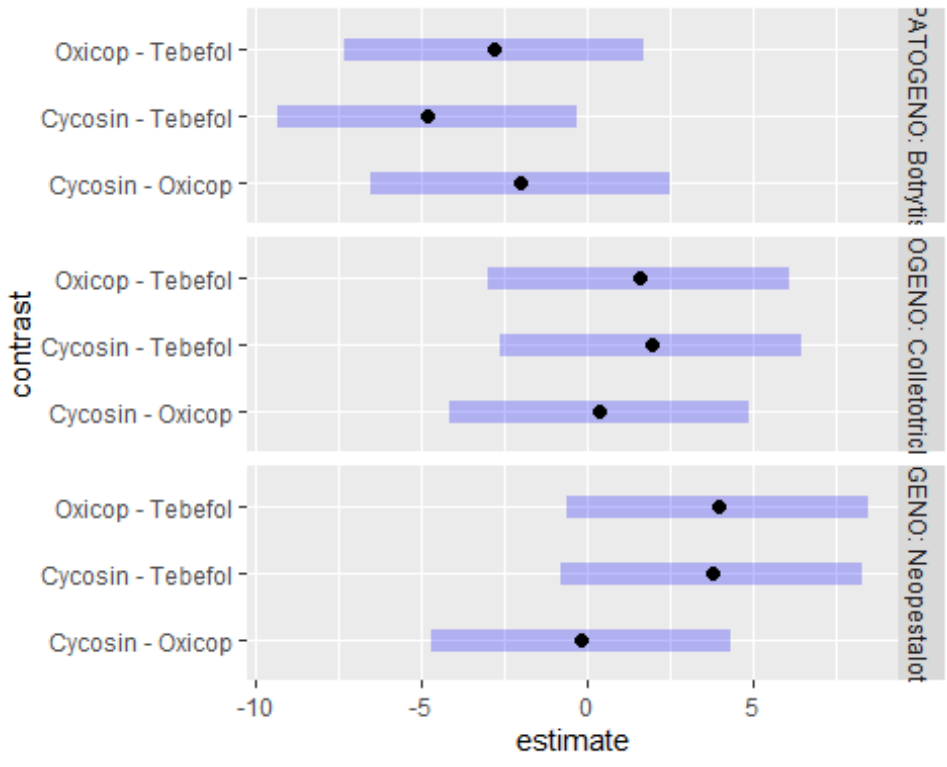
contrast	PATOGENO	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Cycosin - Oxicop	Botrytis	-2.0092593	1.905425	97	-1.0544943	0.5445481
Cycosin - Tebefol	Botrytis	4.8055556	1.905425	97	2.5220393	0.0351804
Oxicop - Tebefol	Botrytis	2.7962963	1.905425	97	1.4675450	0.3109954
Cycosin - Oxicop	Colletotrichum	0.3703704	1.905425	97	0.1943768	0.9793910
Cycosin - Tebefol	Colletotrichum	1.9490741	1.905425	97	1.0229081	0.5642716

contrast	PATOGENO	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Oxicop - Tebeful	Colletotrichum	1.5787037	1.905425	97	0.8285312	0.6862924
Cycosin - Oxicop	Pestalotiopsis	-0.1666667	1.905425	97	-0.0874696	0.9957910
Cycosin - Tebeful	Pestalotiopsis	3.7777778	1.905425	97	1.9826436	0.1219464
Oxicop - Tebeful	Pestalotiopsis	3.9444444	1.905425	97	2.0701132	0.1014580

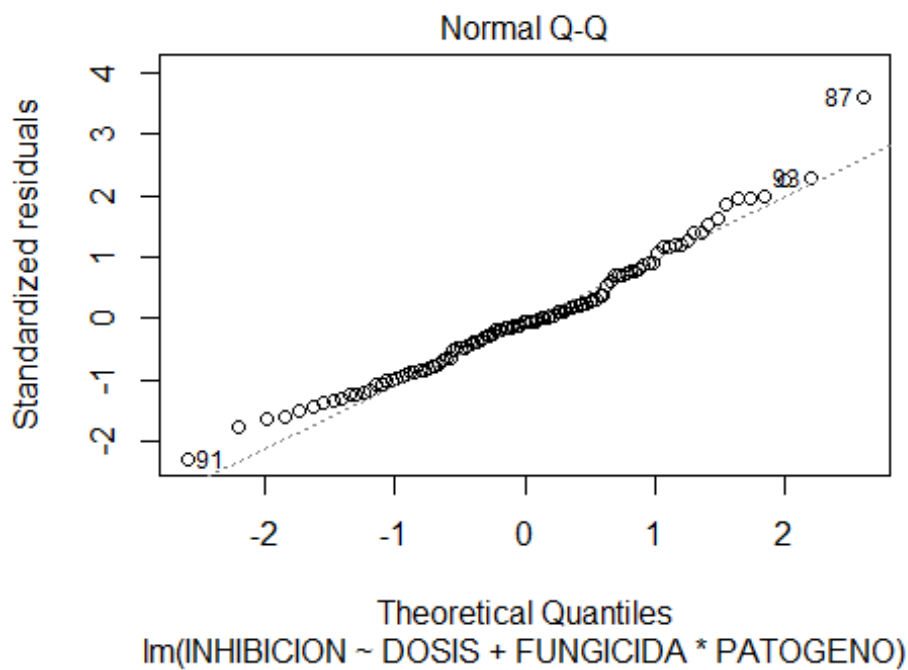
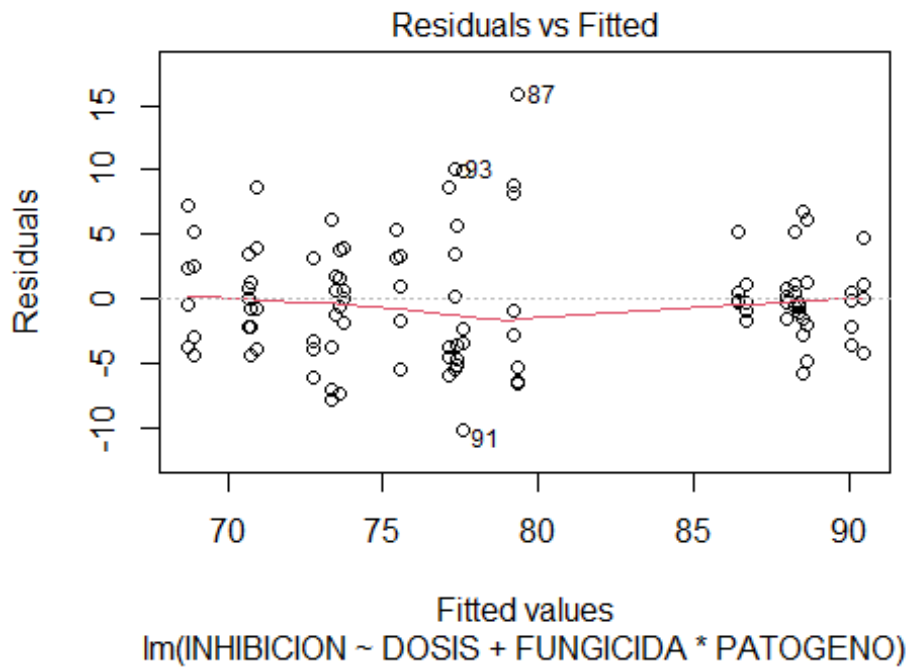
```
mult_comp_mod1 <- emmeans(mod1, pairwise ~ FUNGICIDA | PATOGENO)
kable(mult_comp_mod1$emmeans)
```

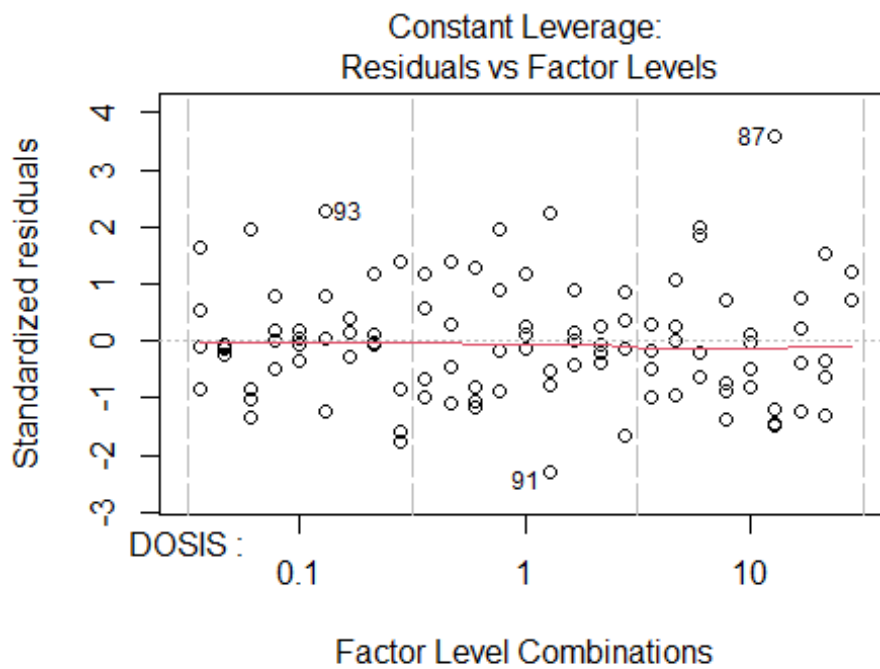
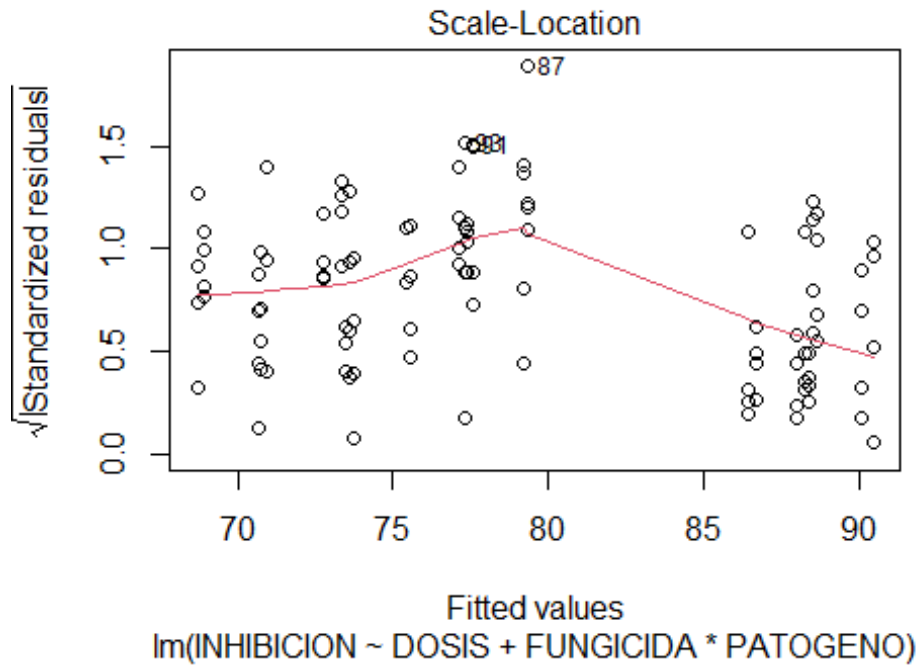
FUNGICIDA	PATOGENO	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
Cycosin	Botrytis	69.46296	1.347339	97	66.78887	72.13706
Oxicop	Botrytis	71.47222	1.347339	97	68.79813	74.14632
Tebeful	Botrytis	74.26852	1.347339	97	71.59442	76.94261
Cycosin	Colletotrichum	89.16667	1.347339	97	86.49257	91.84076
Oxicop	Colletotrichum	88.79630	1.347339	97	86.12220	91.47039
Tebeful	Colletotrichum	87.21759	1.347339	97	84.54350	89.89169
Cycosin	Pestalotiopsis	77.90741	1.347339	97	75.23331	80.58150
Oxicop	Pestalotiopsis	78.07407	1.347339	97	75.39998	80.74817
Tebeful	Pestalotiopsis	74.12963	1.347339	97	71.45554	76.80372

```
# add letters to each mean
plot(mult_comp_mod1$contrasts)
```



`plot(mod1)`





```
shapiro.test(mod1$residuals)
##
## Shapiro-Wilk normality test
```

```
##  
## data: mod1$residuals  
## W = 0.97467, p-value = 0.03697  
hist(mod1$residuals)
```

Histogram of mod1\$residuals

