

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

Identificación del agente causal de la enfermedad de la podredumbre de la corona de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), en tres zonas productoras, Costa Rica

Trabajo final de graduación bajo la modalidad de tesis para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Agricultura Alternativa

Estudiante

Bach. Abelardo Arroyo Vargas

Tutor

M.Sc José Alonso Calvo Araya

Asesores

M.Sc Walter Peraza Padilla
M.Sc. Mairon Madriz Martínez

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2024

Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Agricultura Alternativa.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Dra. Lilliam Quirós Arias
Decana de la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

M. Sc. Johaner Rosales Flores
Representante de dirección de la Escuela de
Ciencias Agrarias

M.Sc. José Alonso Calvo Araya
Tutor

M. Sc. Walter Peraza Padilla
Asesor 1

M. Sc. Mairon Madriz Martínez
Asesor 2

Bach. Abelardo Arroyo Vargas
Postulante

DEDICATORIA

Mi trabajo de tesis está dedicado a mi padre **Henry Arroyo Núñez**, quien me enseñó a trabajar en el campo, a ser una persona extraordinaria, crítica, humilde y a nunca rendirse. A mi madre **Alexandra Vargas Marín** quien confió en mí, me apoyo en los momentos más difíciles de mis estudios y por darme su infinito amor incondicional.

Asimismo, este trabajo está dedicado a la memoria de **Andredi Cordero Carrión**, quién siempre fue un ejemplo a seguir con su gran capacidad, proyección y apoyo en búsqueda de un futuro mejor para mí, mi familia y el sector agropecuario.

Abelardo Arroyo Vargas

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la capacidad de llegar a este punto de mi vida.

A mis padres Henry y Alexandra por darme la oportunidad de estudiar, educarme y sostén en toda mi formación profesional.

A mis hermanos Michael y Alejandra que de una u otra forma me apoyaron en este recorrido universitario.

A mis profesores asesores M. Sc. Alonso Calvo Araya y M. Sc. Walter Peraza Padilla por sus valiosas contribuciones en el desarrollo de esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias, especialmente a M. Sc. Irena Hilje Rodríguez por toda su ayuda brindada.

A mis compañeros y amigos de universidad Isaías Gómez Hidalgo y Osvaldo Quesada Cabezas por darme consejos, risas, soporte y momentos buenos y malos, pero únicos que nunca olvidaré.

A esas personas que por el momento olvido, pero que estuvieron ahí y me ayudaron a completar esta investigación.

Gracias.

Abelardo Arroyo Vargas

RESUMEN

En Costa Rica la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) destaca por ser un cultivo fuente de generación de divisas y continuo crecimiento económico, desarrollándose en pequeños sistemas productivos ubicados alrededor del valle central. En los últimos años ha sido afectado por la enfermedad de la podredumbre de la corona, la cual se caracteriza por síntomas de marchitamiento, clorosis y necrosis de la corona. Esta investigación llevo a cabo muestreos en plantaciones de San Pedro de Poás, Llano Grande y Vásquez de Coronado, en las cuales se efectuaron inspecciones fitosanitarias y la recolección de plantas que evidenciaran la sintomatología de la podredumbre de la corona. Por medio de análisis morfológicos y moleculares se diagnosticó el agente causal de la enfermedad. Además, se evaluó la patogenicidad de los aislamientos por medio de los postulados de Koch y la severidad de la sintomatología en plantas de fresa inoculadas con el agente causal. Por último, se realizaron pruebas *in vitro* para evaluar la capacidad antagónica de cepas de *T. asperellum*, *T. viride* y *T. longibrachiatum*, con medición de la competencia por sustrato y antibiosis. Con base a las inspecciones se encontraron incidencias de 11,67% a 25,33% en las plantaciones, siendo mayores en la localidad de San Pedro de Poás. A partir de los aislamientos de hongos provenientes del tejido vascular de corona, se identificó por su morfología y análisis molecular de la región TEF-1 al patógeno en todas las zonas de estudio. Todos los aislamientos lograron generar patogenicidad en las plantas de fresa inoculadas, con similar sintomatología de necrosis vascular y clorosis foliar vista en los primeros aislamientos, dónde el aislamiento NEO-C3 presentó la mayor severidad. En las pruebas duales, la competencia por sustrato se delimitó en la clase II según la escala utilizada para las tres especies de *Trichoderma*. El tiempo de contacto fue de 96 horas para *T. asperellum* y *T. viride*, en cambio fue más rápido para *T. longibrachiatum* en 72 horas. En tanto a la antibiosis, los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) se establecieron entre 68,89% a 84,44%, dónde *T. longibrachiatum* mostró los mejores valores entre 77,50% a 81,80% con diferencias significativas en todos los enfrentamientos. Los resultados obtenidos permiten identificar al patógeno y a las cepas de *Trichoderma* utilizadas como posibles estrategias de manejo de la enfermedad.

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in Costa Rica stands out for being a crop source of generation of currency and continuous economic growth, developing in small productive systems located around the central valley. In recent years it has been affected by crown rot disease, which is characterized by symptoms of wilting, chlorosis and crown necrosis. This research carried out in plantations of San Pedro de Poás, Llano Grande and Vásquez de Coronado, in which phytosanitary inspections and the collection of plants were carried out to show the symptoms of crown rot. Through morphological and molecular analyses, the causal agent of the disease was determined. In addition, the pathogenicity of the isolates was evaluated through Koch's postulates and the severity of the symptomatology in strawberry plants inoculated with the isolates. Finally, *in vitro* tests were performed to evaluate the antagonistic capacity of *T. asperellum*, *T. viride* and *T. longibrachiatum*, with measurement of competition by substrate and antibiosis. Based on the inspections, incidences of 11,67% to 25,33% were found in the plantations, being greater in the town of San Pedro de Poás. From the isolates of fungi from the vascular tissue of the crown, the pathogen was identified in all study areas due to its morphology and molecular analysis of the TEF-1 region. All the isolates managed to generate pathogenicity in the inoculated strawberry plants, with similar symptoms of vascular necrosis and foliar chlorosis seen in the first isolates, where the NEO-C3 insulation presented the greatest severity. In the dual tests, the substrate competition was delimited in class II according to the scale used for the three *Trichoderma* species. Contact time was 96 hours for *T. asperellum* and *T. viride* but was faster for *T. longibrachiatum* in 72 hours. As for antibiotics, growth inhibition percentages (PCI) were established between 68,89% and 84,44%, where *T. longibrachiatum* showed the best values between 77,50% and 81,80% with significant differences in all confrontations. The results obtained identify the causal agent of strawberry crown rot and *Trichoderma* strains used as possible disease management strategies.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE ANEXOS	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. General	15
2.2. Específicos	15
3. MARCO TEÓRICO	15
3.1. Cultivo de fresa	15
3.2. Clasificación taxonómica	16
3.3. Descripción morfológica	16
3.3.1. Raíz	17
3.3.2. Corona	17
3.3.3. Hojas	17
3.3.4. Flor	18
3.3.5. Fruto	18
3.4. Etapas fenológicas	18
3.5. Importancia del cultivo de fresa	19
3.6. Requerimientos del cultivo de fresa	19
3.7. Enfermedades asociadas al cultivo fresa	20
3.8. Enfermedad de podredumbre de la corona	21
3.9. Postulados de Koch	23
3.10. Manejo de la podredumbre de corona	23

3.11.	Combate biológico	24
3.11.1.	Generalidades de <i>Trichoderma</i> spp.	25
4.	METODOLOGÍA	26
4.1.	Localización del sitio de estudio	26
4.2.	Muestreo, sintomatología e incidencia de la enfermedad	27
4.4.	Cultivos anéxicos	29
4.5.	Identificación taxonómica y caracterización morfológica	29
4.6.	Cultivos monospóricos	30
4.7.	Identificación molecular	31
4.7.1.	Extracción y purificación de ADN	32
4.7.2.	Amplificación por medio de PCR de la región <i>tef1</i>	32
4.7.3.	Secuenciación	33
4.8.	Pruebas de patogenicidad	33
4.9.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	35
4.10.	Evaluación de variables y diseño experimental	36
4.10.1.	Incidencia y severidad	36
4.10.2.	Competencia por sustrato y antibiosis	37
4.10.3.	Diseño experimental	38
4.11.	Análisis estadístico	39
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1.	Sintomatología e incidencia	39
5.2.	Identificación y caracterización morfológica de los aislados	43
5.3.	Identificación molecular	48
5.4.	Pruebas de patogenicidad	49
5.5.	Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	54
5.5.1.	Evaluación de competencia por sustrato y tiempo de contacto	54

5.5.2.	Evaluación de antibiosis	56
6.	CONCLUSIONES	60
7.	RECOMENDACIONES	61
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9.	ANEXOS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mapa de ubicación del invernadero de investigación en la Finca Experimental Santa Lucía, Barva, Heredia</i>	26
Figura 2. <i>Esquema de proceso de diluciones seriadas</i>	31
Figura 3. <i>Procedimiento de inoculación de plantas de fresa</i>	34
Figura 4. <i>Conformación de una prueba de antagonismo por medio de la técnica dual enfrentamiento de un hongo antagonista y un hongo fitopatógeno</i>	35
Figura 5. <i>Sintomatología general de la enfermedad de la podredumbre de la corona en plantas de fresa</i>	39
Figura 6. <i>Colonias de los hongos aislados con 7 días de crecimiento en PDA, aisladas de tejido de la corona de fresa</i>	43
Figura 7. <i>Conidios de los aislados formados en medio PDA</i>	45
Figura 8. <i>Sintomatología de la pudrición de la corona en plantas de fresa cv. San Andreas, resultado de la prueba de patogenicidad de diferentes aislados</i>	50
Figura 9. <i>Síntomas de la podredumbre de corona en plantas de fresa inoculadas con ..</i>	51
Figura 10. <i>Pruebas de cultivo duales de (A)<i>T. asperellum</i>, (B)<i>T. viride</i> y (C) <i>T. longibrachiatum</i> frente al patógeno</i>	55
Figura 11. <i>Gráficas de Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC %) de <i>T. asperellum</i> (TA), <i>T. viride</i> (TV) y <i>T. longibrachiatum</i> (TL) sobre el patógeno</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta de fresa	16
Tabla 2. <i>Principales enfermedades y agentes causales asociados al cultivo de fresa</i>	21
Tabla 3. <i>Descripción de las localidades donde se ubican los puntos de muestreo</i>	27
Tabla 4. <i>Descripción de síntomas presentes</i>	28
Tabla 5. <i>Aislamientos obtenidos por localidad muestreada</i>	30
Tabla 6. <i>Escala visual para medir la severidad de la pudrición de la corona en plantas de fresa</i>	37
Tabla 7. <i>Criterios para evaluar la categoría de antagonismo según ubicación del hongo antagonista sobre el hongo fitopatógeno</i>	38
Tabla 8. <i>Incidencia de la enfermedad de podredumbre de la corona de fresa según localidad, finca y lote analizado</i>	41
Tabla 9. <i>Características morfológicas y culturales de los aislados de hongos en PDA obtenidos de la corona de fresa en este estudio</i>	47
Tabla 10. <i>Identificación molecular y análisis de similitud de los aislados de hongos causantes de la podredumbre de la corona de fresa</i>	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Preparación de medios de cultivo</i>	81
Anexo 2. <i>Análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey de los porcentajes de inhibición (PIC) de las especies de <i>T. asperellum</i>, <i>T. viride</i> y <i>T. longibrachiatum</i> según enfrentamiento. (alfa=0,05)</i>	82

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) pertenece a la familia Rosaceae, al igual que otros cultivos como la mora (*Rubus ulmifolius*), frambuesa (*Rubus idaeus*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*) los cuales son conocidos como berries o frutillas. Muchas especies de *Fragaria* son originarias de la zona de América del Norte, Asia y Europa, pero la especie cultivada con valor comercial es *F. ananassa*. Esta es una planta perenne con el punto de crecimiento meristemático en una corona de donde salen las hojas, bráqueas, coronas auxiliares, inflorescencias y raíces; además las hojas poseen una forma trifoliada y una producción de frutos unidos en un receptáculo (Husaini y Neri, 2016).

Esta fruta, destaca por su valor nutricional, con un abundante contenido de vitaminas y minerales que tienen la capacidad de contrarrestar la desnutrición y enfermedades cardiovasculares. Es fuente rica de vitamina C, conteniendo 58,8 mg por una porción de 100 g, siendo hasta mayor que una naranja promedio por su alto valor de potasio el cual puede estar en 164 miligramos (Chordi, 2013; Huang, 2018). Asimismo, esta fruta aporta bioflavonoides y antocianinas, los cuales son precursores para retrasar el envejecimiento por su acción antioxidante. Además, los altos contenidos en lecitina y pectina llegan a jugar un papel importante en reducir el colesterol en sangre y prevenir la arteriosclerosis (Sarazú, 2018).

En Costa Rica la actividad del cultivo de fresa es una importante fuente de divisas por su continuo crecimiento económico. Esta fruta se desarrolla principalmente en zonas de suelos volcánicos alrededor del Valle Central con siembras menores a una hectárea (ha) (Salazar y David, 2017). Las provincias de Cartago (39%), Alajuela (22%), San José (21%), Heredia (16%) y Puntarenas (3%) presentan la mayor cantidad de productores dedicados a esta actividad (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2014).

En los últimos años, este cultivo se ha visto afectado por la enfermedad “podredumbre o muerte de la corona” o también llamada “secadera”, la cual es considerada devastadora para el cultivo, ya que causa la muerte progresiva de las plantas desde etapas tempranas (Mariscal *et al.*, 2017). Dentro de los síntomas más comunes presentados por esta enfermedad, destaca un marchitamiento de la planta y una coloración rojiza intervenal de las hojas, que finaliza en coloración marrón a café en las hojas viejas, además de escaso desarrollo vegetativo (Hidrobo, 2020).

En investigaciones realizadas en Costa Rica por el Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del Instituto Tecnológico de Transferencia Agrícola (INTA) y otras instituciones en el desarrollo del Programa de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria para el cultivo de fresa (PITTA-Fresa) han tratado de dar lucha a esta problemática. Los anteriores en su informe de resultados internos, han señalado con mayor frecuencia en las muestras analizadas los patógenos *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum* Schltdl, *Fusarium solani* Mart, *Macrophomina phaseolina* Tassiy, *Pestalotia* sp., *Phytophthora cactorum* Lebert & Cohn, *Phytophthora* sp., *Pitio* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp., *Verticillium* spp. (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2017). Por otra parte, investigaciones en México han asociado esta enfermedad a diversos patógenos como *Fusarium* spp., *Verticillium* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora* spp. (Mariscal *et al.*, 2017; Bárcenas *et al.*, 2019).

Entre los sistemas productivos, la práctica más frecuente para el combate de enfermedades de corona es la desinfección del suelo con fumigantes, como metil isocianato, dazomet, metam sodio y metam potasio. El uso constante de estos productos genera la ocurrencia de nuevas enfermedades fúngicas y el resurgimiento de otras durante los últimos años (Chamorro, 2014). La alta susceptibilidad de las plantas a la enfermedad resulta en una amenaza, lo que provoca mayores aplicaciones de plaguicidas que perjudican al consumidor, personal trabajador y el ambiente (Hidrobo, 2020).

Con relación a esta situación fitosanitaria, para finales del año 2014 según datos de la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, se estimó una superficie cultivada de 181 ha. Estas cifras se redujeron a 171 ha (2015), 151 ha (2017) y 150 ha (2018). En conjunto con la producción, esta fue estimada en el año 2014 en 6.194 toneladas, 5.440 t (2015), 4.300 t (2017) y manteniéndose en 4.300 t en 2018, lo que presentó una reducción de 30% de la producción (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria [SEPSA], 2018; SEPSA, 2019).

En el contexto de desarrollo de la problemática del cultivo de fresa en el país, es de suma importancia realizar investigaciones para diagnosticar correctamente el o los agentes causales de la enfermedad conocida como podredumbre de la corona de fresa. Como base para el desarrollo de esta investigación, se ha tomado referencia la experiencia previa en análisis durante la formación académica como la práctica profesional supervisada (PPS) en el diagnóstico de enfermedades en plantas de fresa, con la iniciativa de proseguir con resultados más concluyentes

sobre estos patógenos asociados a este cultivo. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar el agente causal de la enfermedad de la podredumbre de la corona de la fresa en tres zonas productoras y de esta manera generar información para su adecuado diagnóstico, prevención y manejo dentro en los sistemas productivos de esta fruta en el Valle Central de Costa Rica.

2. OBJETIVOS

2.1. General

- Diagnosticar los microorganismos fitopatógenos asociados a la podredumbre de la corona de fresa (*Fragaria x ananassa*) por medio de aislamientos, características morfológicas, pruebas de patogenicidad y evaluación de hongos antagonistas en pruebas *in vitro* para la implementación de estrategias de manejo de la enfermedad.

2.2. Específicos

- Identificar los microorganismos fitopatógenos a nivel taxonómico y molecular asociados a plantas de fresa con síntomas de la podredumbre de la corona.
- Comprobar la patogenicidad por medio de la aplicación de los postulados de Koch y evaluación de la severidad de los microorganismos aislados.
- Realizar pruebas *in vitro* para evaluar la capacidad antagónica de tres especies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. viride* y *T. longibrachiatum*) contra los microorganismos asociados a la enfermedad de la podredumbre de la corona de fresa por medio de la medición de competencia por sustrato y antibiosis para la implementación como estrategias de manejo biológico de la enfermedad.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Cultivo de fresa

Las plantas de fresa que se comercializan actualmente son provenientes de la hibridación de *Fragaria chiloensis* L. Duch y *Fragaria virginiana* Duch, esta es conocida como fresón en muchos países, siendo relacionada a zonas de climas más fríos (Rivera, 2017). Las primeras

introducciones de híbridos se dieron en Europa, proveniente desde los centros de diversidad en Estados Unidos y Chile. Posteriormente, esta inclusión dio el salto a América del Norte a inicios del siglo XIX y luego al resto del mundo. La selección de *F. ananassa* fue a causa de sus características de superioridad hortícola y diversidad fenotípica, siendo enfocada para la domesticación y enfoque en el área agrícola sobre las demás especies parentales (Hardigan *et al.*, 2021).

3.2. Clasificación taxonómica

La planta de fresa pertenece al orden Rosales, específicamente a la familia Rosaceae y en la Tabla 1 se detalla su clasificación (Centro Internacional de Biociencias Agrícolas (CABI), 2022).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la planta de fresa

Reino	Plantae
Phylum	Espermatophyta
Clase	Dicotyledonae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Fragaria
Especie	<i>F. ananassa</i>

Fuente: CABI, 2019.

3.3. Descripción morfológica

Es una planta herbácea y perenne, donde su desarrollo está determinado por las condiciones ambientales bióticas y abióticas, por lo que la implementación de sistemas de protección de cultivos como invernaderos o túneles es necesaria para aumentar el crecimiento vegetal y la producción. En el mercado existen variedades desarrolladas en base a su fotoperiodo, siendo de día corto, día neutro y día largo según las condiciones que se presenten para generar la

inducción de la etapa de floración (Abad *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2021). La planta en general se encuentra compuesta por raíces, coronas, hojas, flores y frutos.

En cuanto a su reproducción puede desarrollarse sexualmente, por medio del uso de flores y frutos, y asexualmente. Esta última es mediante el desarrollo de estolones o también llamados corredores, los cuales poseen nudos donde se da el crecimiento de plantas hijas. Poseen un crecimiento pequeño de hojas en forma de roseta y raíces según la madurez, siendo una práctica fundamental para la reproducción de plantas a nivel comercial (Shi *et al.*, 2021).

3.3.1. Raíz

El sistema radicular es fasciculado, es decir, hay raíces primarias y raicillas (secundarias). El desarrollo de esta parte de la planta depende de varios factores como el tipo de suelo o algunos otros factores limitantes del desarrollo. El crecimiento se da de manera vertical y horizontal, alcanzando hasta 30 cm de profundidad (CCB, 2020).

3.3.2. Corona

La parte central se conoce como corona, la cual es un tallo comprimido que se encuentra en la superficie del suelo y de donde brotan las yemas axilares, los estolones y comienza la formación de raíces. Complementario al desarrollo de la corona, en cada hoja existe una yema axilar, la cual puede desencadenar el crecimiento de una nueva corona lateral o de estolones, siendo clave las condiciones ambientales como horas luz y temperaturas para la estimulación. Las coronas laterales son importantes en la producción, ya que de ellas brotarán nuevas flores y hojas agregando competitividad a la corona central (Namesny *et al.*, 2022).

3.3.3. Hojas

Las hojas son trifoliadas, con crecimiento en roseta, con el surgimiento de las hojas nuevas en el centro de la planta hasta que pasan a los lados en la madurez, estas brotan en un rango de 8 a 12 días. En la planta ocurre la circulación de nutrientes de hojas maduras hacía hojas más nuevas para continuar con el proceso de crecimiento. Estas últimas se mantienen durante largos periodos para sustentar la capacidad fotosintética (Bolda *et al.*, 2015). Sus bordes son pinnados y cuentan con las características básicas de epidermis y mesófilo típicos, donde destaca la ubicación de las estomas en el envés. Además, el desarrollo de mayor masa foliar

puede estar influenciada por las fertilizaciones nitrogenadas y la variedad aumentando su tamaño (Namesny *et al.*, 2022).

3.3.4. Flor

Las flores se originan de las yemas axilares donde se desarrollan en un tipo de ramilletes que crecen fuera de la bráctea. La flor primaria (primera flor que se forma) permite que se desarrollen las flores secundarias debajo de ella, lo que a su vez permite desarrollar flores terciarias bajo las secundarias y así continúa el patrón de desarrollo (Rueda, 2015). Las flores pueden ser auto polinizadas por el viento, gracias a ello no existe una dependencia directa de insectos polinizadores para ser fecundada, aunque la polinización cruzada por insectos puede mejorar algunas variables contempladas en la calidad del fruto tales como calibre, longitud, peso fresco, peso seco y número de semillas. El desarrollo de la flor hasta la madurez toma de 2 a 3 semanas; sin embargo, esto va a depender de las temperaturas ambientales (Poveda *et al.*, 2018).

3.3.5. Fruto

El fruto no es más que en su mayor parte receptáculo, el cual es la parte de la fruta más carnosa. Sobre la epidermis de esta fruta se ven comúnmente unas “semillitas”, las cuales son los aquenios, mismos que se desarrollan de los pistilos una vez polinizados. Las flores primarias se convierten en fruto primero, y son estas las más grandes. Las flores secundarias y terciarias por su parte son las segundas y terceras más grandes en tamaño respectivamente (Sánchez, 2015).

3.4. Etapas fenológicas

La fenología, está dividida en las etapas vegetativa, reproductiva y productiva. La vegetativa contempla la brotación de yemas principales donde inician a crecer, el desarrollo de las primeras hojas emergentes y comienzo de formación de estolones. La etapa reproductiva se caracteriza por la aparición de las primeras yemas florales salidas y luego flores abiertas hasta la caída de pétalos. Por último, la etapa productiva, es donde se llega a la formación y maduración del fruto; además, es donde se necesitan mayores requerimientos nutricionales. De acuerdo con el desarrollo de las plantas, estas presentan su primera cosecha entre los 90 a 120 días luego de la siembra (Patiño *et al.*, 2015).

3.5. Importancia del cultivo de fresa

Según los últimos datos reportados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés), la producción mundial de fresa se encuentra en 12,2 millones de toneladas (t) en un área de 511.000 ha. El principal productor de esta fruta China con 3,3 millones de toneladas, seguida de Estados Unidos de América (EE. UU.) con 1,0 millones de toneladas y en tercer lugar Egipto con 597.000 t. Entre los países que más área cultivada tienen está China, Polonia, Rusia, Turquía y EE. UU, este último, es el país que presenta mayor rendimiento con 60.000 kg·ha⁻¹ (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO], 2022).

La fresa se cultiva en aproximadamente 76 países, lo que refleja no solo el favoritismo de las personas hacia el consumo, sino también su valor monetario para muchas economías locales. En el continente americano, los países que destacan en la producción de fresas son EE. UU y México. La producción se concentra en los estados de California y Florida en Estados Unidos y en los estados de Michoacán y Baja California en México (Hytönen *et al.*, 2018).

En Costa Rica, la producción de fresas se concentra en zonas altas que presentan condiciones favorables de temperatura, generalmente en el Valle Central. Las zonas principales son Fraijanes y Poasito (Alajuela), Vara Blanca (Heredia), Llano Grande (Cartago) y Vásquez de Coronado (San José). La fresa ha sido cultivada por más de 30 años en el país donde inició con variedades como Chandler y Oso Grande importadas de viveros de California. Actualmente estas variedades han sido sustituidas por nuevos cultivares como Festival, San Andreas, Abión y Elyana (Castro, 2017).

3.6. Requerimientos del cultivo de fresa

La planta de fresa se desenvuelve de forma adecuada en temperaturas frescas, entre los 18 a 25°C en el día y 8 a 13°C en las noches. Puede ser cultivada en zonas medianamente bajas y altas, con regímenes de humedades relativas entre 60 a 75%. Los suelos deben ser ligeros, de texturas arenosas, los cuales son aireados y bien drenados para un buen desarrollo radicular, con pHs moderadamente ácidos (Cámara de Comercio de Bogotá [CCB], 2015). A nivel nacional, alrededor del 90% de la producción se desarrolla bajo un sistema de ambiente protegido dentro

de invernaderos, tanto directo en el suelo como hidropónicos; mientras que la producción restante se establece bajo el sistema de microtúnel (MAG, 2007).

En aspectos nutricionales, este cultivo necesita cantidades consideradas de nitrógeno (N) para un desarrollo vegetal y producción óptima, siendo perjudicial excesos con daños en inducciones florales y aumento en la tasa de respiración. En el caso del fósforo (P) se utiliza para estimulación de raíces y floración; una deficiencia en este elemento puede causar problemas en el tamaño de las flores, albinismo y aroma.

En el caso del potasio (K) es clave en la fijación de dióxido de carbono, cierre estomático y transporte de azúcares. Además, el calcio (Ca) es fundamental para la firmeza del fruto, división celular y síntesis de hormonas. Asimismo, otros minerales como hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), boro (B) y zinc (Zn) son necesarios en bajas cantidades, aun así, es necesario que sean suministrados dentro de los planes de fertilización (Strand, 2008; Guaqueta, 2019).

Según Castro (2017) la dosificación recomendada de nutrientes para el cultivo de fresa debe tener $150,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ N, $37,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ P, $257,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ K, $93,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Ca, $35,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Mg, $17,0 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ S, $0,2 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Cu, $0,4 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Zn, $1,6 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ Mn y $0,3 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ B. Sobre este tema, Salazar y David (2017) mencionan que los aspectos nutricionales se han relacionado con gran influencia hacia la susceptibilidad a enfermedades.

3.7. Enfermedades asociadas al cultivo fresa

Existe una cantidad considerable de patógenos que pueden causar enfermedades en el cultivo de fresa. En la siguiente tabla, se mencionan las principales enfermedades y agentes causales (Tabla 2).

Tabla 2*Principales enfermedades y agentes causales asociados al cultivo de fresa*

Agente	Enfermedad	Agente Causal
Enfermedades causadas por oomycetes	Podredumbre de la corona y fruto / Corazón rojizo	<i>P. cactorum</i> <i>Phytophthora fragariae</i> Hickman 1940
	Antracnosis	<i>Colletotrichum</i> spp.
	Verticiliosis	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb
	Podredumbre carbonosa	<i>M. phaseolina</i>
Enfermedades causadas por hongos	Rizoctiosis	<i>R. solani</i> <i>Rhizoctonia fragariae</i> Husain & Mckeen
	Podredumbre de corona / Marchitamiento vascular / Fusariosis	<i>F. oxysporum</i> <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i> Winks & Williams
	Mancha púrpura	<i>Ramularia grevilleana</i> Tul. & C. Tul. Ex Oudem
	Podredumbre gris	<i>B. cinerea</i> Pers.
	Mancha zonal	<i>Gnomoniopsis comari</i> P. Karst
	Enfermedades causadas por bacterias	Mancha aceitosa
Nematodos	Nematodo del rizado de la fresa	<i>Aphelenchoides fragariae</i> Ritzema Bos
	Nematodos formadores de nódulos	<i>Meloidogyne</i> spp.
	Nematodos lesionadores	<i>Pratylenchus penetrans</i> Cobb

Fuente: Correa y Alarcón, 2015; Machín, 2017; Morales *et al.*, 2017; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019.

3.8. Enfermedad de podredumbre de la corona

Esta enfermedad ha sido asociada a diversidad de agentes causales. En investigaciones realizadas por Peres & Baggio (2019) señalan a *Phytophthora cactorum* como uno de los principales patógenos en plantaciones donde puede llegar a tener un nivel de incidencia de hasta

un 30%. Asimismo, estudios hechos por Marín *et al.* (2018) destacan la inclusión de *P. nicotianae* Bresa de Haan como nueva especie en la pudrición de corona. Adicionalmente, Noh *et al.* (2018) menciona que *P. cactorum* causa afectación en frutos, con síntomas de canchales, marchitez y tizones en las hojas y plantas; no obstante, su afectación es más común en la corona.

Este patógeno se ve favorecido por condiciones cálidas y húmedas en el periodo de establecimiento, así como en momentos de estrés de la planta. Los síntomas se caracterizan por la presencia de lesiones necróticas con coloraciones marrones oscuras combinadas con rojizos claros. En el área foliar se identifica por mostrar un aspecto acuoso y coloración marrón claro de las hojas, que incrementa su intensidad según el avance. En el caso de las raíces se ven afectadas luego de la invasión total del rizoma (López, 2021).

En otras investigaciones Chun *et al.* (2021) determinaron a *Colletotrichum siamense* Prihast., L. Cai & K. D. Hyde como nuevo hongo causante de la enfermedad, lo que extiende la lista de especies de este género que afectan las plantas de fresa. Hace algún tiempo se destacaba a *C. acutatum* J. H. Simmonds como primordial causante de antracnosis en frutos de fresa, *C. gloeosporioides* Penz & Sacc y *C. fragariae* A. N. Brooks, considerados de gran relevancia. Las afectaciones se enfocan principalmente en la corona; sin embargo, estos patógenos se han logrado identificar en otras partes como peciolo y estolones.

Los síntomas están centrados en tizones en tejidos aéreos con manchas necróticas irregulares y pudrición de frutos, además de retraso en el crecimiento y clorosis de las hojas asociados a la necrosis de raíces. Dentro de la corona se muestran manchas necróticas con tonalidades marrón oscuro y rojizo (Zhang *et al.*, 2020).

Para la podredumbre de la corona, Sánchez *et al.* (2016) reportan al hongo *M. phaseolina*, la cual ha tenido relevancia en el cultivo en la década pasada, planteando alertas de emergencia en zonas especializadas como California en Estados Unidos y Huelva en España. En estos sitios ha causado graves problemas en plantaciones relacionados con el estrés hídrico y condiciones de temperatura que son los momentos oportunos donde hay más afectación. Los síntomas se relacionan con el marchitamiento de la planta con afectación inicial en las hojas viejas, dejando las hojas nuevas sanas dificultando el crecimiento, los tejidos internos de la corona muestran lesiones necróticas agrietadas y con coloraciones marrón naranja. Asimismo, investigaciones hechas por Bárcenas *et al.* (2019) mencionan el hongo más frecuentemente aislado de varias zonas de México fue *F. oxysporum*, con ataques en momentos tempranos de la plantación y

generando mermas de plantas de hasta un 50%. Adicionalmente, otros hongos encontrados fueron *V. dahliae* y *R. solani*.

De acuerdo con Chamorro *et al.* (2016) los síntomas consisten en decoloraciones del tejido vascular de la corona en manchas necróticas de color marrón. Otras investigaciones indican que las afectaciones en plantas se deben a *N. mesopotamica* Maharachch, K.D. Hyde & Crous el cual causa coloraciones en las hojas y afectación en coronas (Hidrobo *et al.*, 2021). Asimismo, Wu *et al.* (2021) encontró a *N. rosae* Maharachch, K.D. Hyde & Crous como nueva especie que afecta la corona de la planta de fresa. Por otro lado, los resultados han mostrado una gran similitud en morfología y síntomas de este género con hongos del género *Pestalotiopsis*, al cual también varias especies se han adjudicado como agentes causales de la enfermedad (Ara *et al.*, 2017).

3.9. Postulados de Koch

Estos postulados fueron propuestos por Robert Koch (1843-1910) para determinar cuáles organismos son patogénicos. Esta técnica consiste en cuatro pasos que permiten comprobar la patogenicidad de los microorganismos asociados a determinada enfermedad (Rivera, 2018):

- I. El organismo sospechoso debe estar en todos los individuos que presentan la enfermedad.
- II. El organismo debe ser aislado en un medio de cultivo y obtenerse en forma pura, para registrar sus características morfológicas, bioquímicas o moleculares.
- III. El organismo debe ser inoculado en plantas sanas de la misma especie de donde se obtuvo y producir los mismos síntomas observados al inicio.
- IV. El organismo debe ser reaislado a partir de las plantas inoculadas y las características de este deben ser las mismas que las observadas en el segundo postulado.

3.10. Manejo de la podredumbre de corona

Dentro de las estrategias utilizadas, está el uso de fumigantes de suelo antes de realizar el trasplante de plántulas. Anteriormente, esto se realizaba con Bromuro de Metilo, pero a causa de la prohibición en muchos países, otras moléculas como 1,3-dicloropropano, metam sodio o metam potasio han sido utilizadas, con la finalidad de reducir el inóculo primario de los suelos

(Sánchez *et al.*, 2016). Diferentes estrategias culturales como el uso de coberturas plásticas, recolección de residuos de cosecha y la solarización disminuyen las poblaciones de patógenos en el suelo (Baggio *et al.* 2021).

La literatura menciona diversos microorganismos antagonistas como *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf & Nirenberg y *Bacillus megaterium* de Bary como alternativas al manejo convencional de la enfermedad y estos pueden tener igual y mejor eficacia en comparación a fungicidas químicos (Pastrana *et al.* 2016; Widyaningsih & Triasih, 2021). Otro hongo micoparasito que ha demostrado ejercer buen control sobre la enfermedad es *Aureobasidium pullulans* de Bary & Löwenthal.

3.11. Combate biológico

Este concepto nació a principios del siglo XIX, cuando un grupo de naturalistas comenzaron a discutir sobre la importancia de los organismos en la naturaleza, abarcando el concepto de restablecimiento de los órdenes equilibrados que existía en el ambiente antes de ser perturbado (Badii & Abreu, 2006).

En fitopatología el término de control biológico ha sido tradicionalmente usado para describir las acciones o estrategias para combatir enfermedades a partir de otros microorganismos vivos. Baker y Cook (1974, 1983) son considerados los padres del control biológico de enfermedades de plantas y lo definen como “la reducción de la densidad de inóculo de un patógeno o de su actividad productora de enfermedad, a través de uno o más organismos diferentes al hombre, realizado naturalmente, o a través de la manipulación del medio ambiente, hospedante o antagonista”. De la misma manera, en fitopatología, a estos microorganismos ya sean bacterias, levaduras y hongos se le llama antagonistas, por el efecto de control en diferentes patógenos de interés (Hernández *et al.*, 2007).

Los objetivos principales de este tipo de control son la mitigación de los efectos nocivos, pérdidas económicas y disminución del uso de plaguicidas. Asimismo, el nulo efecto negativo en los trabajadores, papel importante en un ambiente lleno de biodiversidad y obtención de productos agrícolas libres de residuos químicos (Viera *et al.*, 2020).

Las pruebas de antagonismo entre hongos permiten conocer algunas características de los hongos evaluados junto con las diferentes reacciones al desarrollarse en presencia del otro hongo. Entre esta información se destaca el ciclo de vida, tipo de reproducción y la capacidad de

sobrevivencia (Espino *et al.*, 2017). Es importante destacar los mecanismos de acción que interfieren en el antagonismo, ya que pueden existir tres mecanismos directos los cuales son la antibiosis, competencia y micoparasitismo. También existen tres mecanismos indirectos que son la inducción a resistencia, detoxificación de toxinas excretadas y la desactivación de enzimas (Ramírez *et al.*, 2013 y De Lucca, 2015).

3.11.1. Generalidades de *Trichoderma* spp.

Entre los principales hongos con actividad antagónica destacan distintas especies pertenecientes al género *Trichoderma* Pers., las cuales se caracterizan por ser reportadas en múltiples investigaciones con capacidad parasitaria para gran cantidad de hongos fitopatógenos (Morales *et al.*, 2020). Según Romero (2018) los mecanismos de acción son la producción de metabolitos con capacidad antibiótica, la competencia por espacio y nutrientes, y parasitismo directo. Es por esto, que las especies de este género son muy utilizadas en la agricultura por su uso versátil, fácil manipulación y capacidad de adaptación, donde destacan por ser competidoras naturales (Samaniego *et al.*, 2018).

En su clasificación taxonómica pertenece al phylum Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales dentro de la familia Hypocreaceae (Ye *et al.*, 2023). Dentro de sus características morfológicas, este género desarrolla micelio con septos simples, con células haploides formadas por paredes de quitina y glucano. En su reproducción construye conidióforos hialinos ramificados, los cuales pueden estar en grupos o solos. Los conidios presentan una forma ovalada, unicelulares, con cloración usualmente verde, asimismo crea clamidosporas necesarias para enfrentar condiciones difíciles en el suelo (Companioni *et al.*, 2019). Su crecimiento en medio de cultivo *in vitro* es rápido, con el desarrollo de colonias en forma de anillos concéntricos y coloraciones que van desde blanco, amarillas y usualmente verdes (Gómez, 2017).

El uso de *Trichoderma* sp. para la enfermedad de la pudrición de la corona en el cultivo de fresa ha sido reportada por Samaniego *et al.* (2018), quienes mencionan que se determinó la inhibición de crecimiento en pruebas *in vitro* de *Fusarium* sp. y *M. phaseolina*. Asimismo, Aziz & Marzani (2017) señalan que *Trichoderma harzianum* Rifai es un posible agente antagonista de las especies de *R. solani* y *R. fragariae*. Por otra parte, Widyaningsih & Triasih (2021) han demostrado la efectividad de esta especie contra *Pestalotiopsis* sp.

4. METODOLOGÍA

4.1. Localización del sitio de estudio

La investigación se llevó a cabo en Laboratorio de Fitopatología de Docencia de la Escuela de Ciencias Agrarias y en el invernadero de Docencia de la Finca Experimental Santa Lucía (FESL) ubicado en las coordenadas $10^{\circ}02'22.4''N$ y $-84^{\circ}11'21.4''O$, a una altitud promedio de 1.200 m.s.n.m. (Figura 1).

Figura 1

Mapa de ubicación del invernadero de investigación en la Finca Experimental Santa Lucía, Barva, Heredia.



El comportamiento climático de la zona está basado en el clima de la región central, influenciado por la Cordillera Volcánica Central, específicamente por el volcán Barva (Comisión de Cambio Climático de Barva, 2019). Dentro de los parámetros promedios, las precipitaciones se establecen dentro de los 2.000 a 3.000 mm por año, temperaturas mínimas rondando los $15^{\circ}C$ y temperaturas máximas de $25^{\circ}C$, y valores de humedad relativa de 70 a 90%. Los meses de septiembre, octubre y noviembre son los que poseen menos cantidad de horas de sol durante el año (Climatedata, s.f).

Las fincas muestreadas se encuentran ubicadas en las zonas productoras de Poás, Llano Grande y Vázquez de Coronado (Tabla 3).

Tabla 3

Descripción de las localidades donde se ubican los puntos de muestreo

Localidad	Cantón	Precipitación media anual (mm)*	Temperatura media anual (°C)*	Identificación
Llano Grande	Cartago	159,54	14,28	A
				B
San Pedro y Sabana Redonda	Poás	275,65	17,18	C
				D
San Rafael	Vázquez Coronado	129,9	16,70	E

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

4.2. Muestreo, sintomatología e incidencia de la enfermedad

Según los registros en cada finca se eligió de forma dirigida el lote que presentará mayor incidencia de la enfermedad de la podredumbre de corona. Con períodos posteriores de siembra entre los 2 y 12 meses, y sin importar el tipo de sistema de producción, siendo en suelo o sustratos hidropónicos.

Se llevó a cabo un recorrido en el lote para observar el estado fitosanitario y determinar la proporción de plantas enfermas. La toma de la muestra se basó en toda la planta, donde en cada finca se recolectaron cinco plantas. Estas se manipularon según las medidas de seguridad y transporte del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria para una buena conservación hasta el laboratorio (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria [INTA], 2017).

La clasificación de síntomas se realizó según las descripciones de López (2021), donde señala como síntomas principales observables el marchitamiento, clorosis, enanismo, lesiones

necróticas en base axial de las hojas y presencia de raíces negras. Se determinó que el síntoma principal fue la pudrición de la corona con áreas necróticas en los tejidos internos con coloraciones marrón naranja, directamente relacionadas a la marchitez y debilitamiento de la planta.

La incidencia de la enfermedad se evaluó por medio de la contabilización de plantas enfermas y la cantidad total de plantas presentes en el lote. Este porcentaje se calculó por medio de la siguiente fórmula (Castellanos *et al.*, 2020):

$$\text{Incidencia (\%)} = (\text{Número de plantas enfermas} / \text{Total de plantas del lote muestreado}) \times 100$$

4.3. Aislamientos

Las muestras fueron identificadas de acuerdo con el lugar de procedencia y el número de muestra, para ser utilizada durante toda la investigación. Cada muestra se lavó con agua potable con el fin de eliminar las partículas de suciedad provenientes del campo. Posteriormente, se describió la sintomatología presente en cada parte de la planta (hojas, corona y raíces) (Tabla 4).

Tabla 4

Descripción de síntomas presentes

Órgano	Observación
Hojas	Se determinó la presencia de lesiones necróticas, clorosis, enanismo, coloraciones anormales en los folíolos y peciolo.
Corona	Se realizaron cortes longitudinales para evaluación de los tejidos vasculares con la presencia de lesiones necróticas o coloraciones.
Raíces	Se evaluó el estado fitosanitario de las raíces con la observación de lesiones necróticas.

Se utilizaron tejidos provenientes de la corona para realizar los aislamientos, previamente evaluados visualmente. Se realizó un corte longitudinal, con los cuales se formaron pequeños trozos de material interno afectado, y se sometió a un proceso de desinfección que consistió en la inmersión dentro de una gasa esterilizada en una solución de 75% etanol (C₂H₅OH) durante 30

segundos, 0,50% hipoclorito de sodio (NaClO) durante 60 segundos y dos lavados en agua destilada estéril durante un minuto cada uno (Muñoz *et al.*, 2020).

Posteriormente en condiciones axénicas, se tomaron cuatro trozos desinfectados y se colocaron por triplicado en cada placa Petri con medio de cultivo PDA acidificado (Anexo 1), siendo repetido en dos ocasiones. Todos los platos Petri se sellaron con Parafilm y se mantuvieron en incubación a una temperatura de 26 ± 2 °C.

4.4. Cultivos anéxicos

Para el desarrollo de los cultivos anéxicos, se evaluaron los aislamientos con 48 horas de incubación observando al microscopio. Seguidamente se procedió a la purificación de los microorganismos aislados, la selección se realizó basada en la identificación por medio de conidios. Este proceso se llevó a cabo con el uso de una aguja de disección y bisturí previamente desinfectados, tomando parte del tejido (hifas) que estuviera creciendo para colocarlo en una nueva placa Petri.

4.5. Identificación taxonómica y caracterización morfológica

La identificación morfológica se realizó mediante la metodología planteada por Lazarotto *et al.* (2014), basada en el análisis de las colonias, crecimiento, pigmentación de la colonia y las características de las esporas como forma y ancho y largo. También se utilizaron las claves dicotómicas de Dugan (2006), Maharachchikumbura *et al.* (2014) y Singleton *et al.* (1992) y Watanabe (2018). Esta identificación se hizo mediante la toma de micelio y estructuras reproductivas para ser observada en el microscopio.

Basados en la determinación de crecimientos miceliales distintos y características morfológicas se seleccionaron los crecimientos miceliales diferenciados para analizar a profundidad, siendo un total de ocho muestras (Tabla 5).

Tabla 5*Aislamientos obtenidos por localidad muestreada*

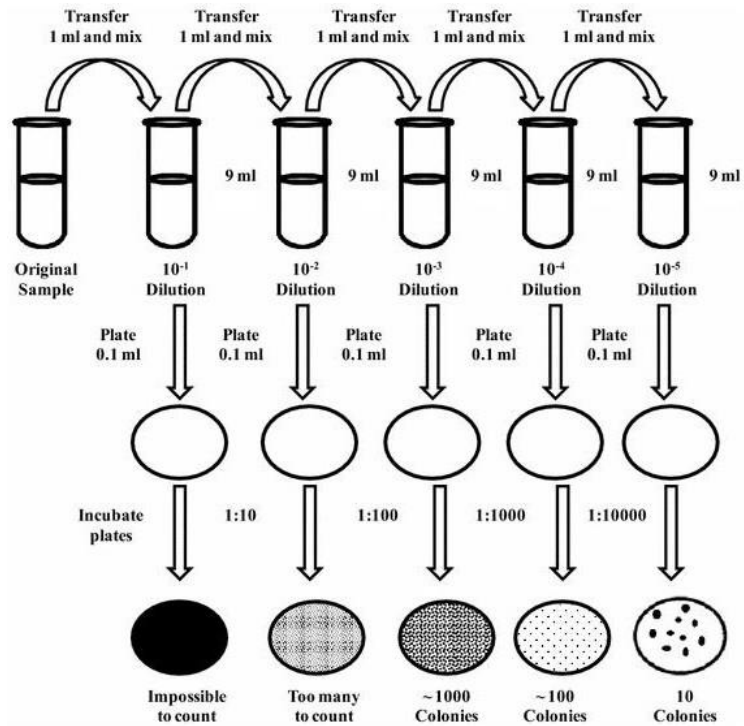
Localidad	Muestra
Llano Grande	NEO-A4, NEO-B1 y NEO-B6
Poás	NEO-C3, NEO-C5, NEO-D1 y NEO-D5
San Rafael	NEO-E5

4.6. Cultivos monospóricos

Estos cultivos se basaron en los cultivos anéxicos. Una vez que estos se encontraron esporulados, se procedió a purificar en una nueva placa con medio de cultivo PDA, de la cual se generaron los cultivos monospóricos. Para esto se utilizó la metodología de diluciones modificada de Prieto (2019), donde primero se procedió a realizar un raspado en el micelio, agregando 2,0 ml de agua destilada estéril. Con ayuda de un asa bacteriológica se hicieron suaves movimientos para uniformizar y desprender las esporas. Luego se continuó a hacer diluciones, iniciando por tomar una alícuota de 100,0 μl en un tubo de ensayo con 900,0 μl de agua destilada estéril (10^{-1}), la cual se agitó para tomar 100,0 μl colocados en un nuevo tubo de ensayo con 900,0 μl de agua destilada estéril (10^{-2}) (Prabha *et al.*, 2017) (Figura 2). Estos pasos se aplicaron hasta llegar a una concentración de 10^{-6} UFC·ml⁻¹, el conteo de esporas se realizó en la cámara de Neubauer.

Figura 2

Esquema de proceso de diluciones seriadas



Fuente: Prabha *et al.*, 2017.

De la suspensión obtenida, se tomaron 200,0 μ l para ser ubicados en una nueva placa Petri con medio de cultivo. Después de 24 h se observaron las estructuras diagnósticas para multiplicación. Con una aguja de disección estéril se tomaron las esporas a una nueva placa. En un periodo de 72 h se evaluaron las placas para determinar la existencia de contaminaciones, procediendo a realizar nuevamente la purificación en caso de que fuera necesario (Brunner *et al.*, 2013).

4.7. Identificación molecular

La extracción, purificación y reacciones de cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias.

4.7.1. Extracción y purificación de ADN

El proceso de extracción de ADN se llevó a cabo según la metodología modificada de Hoyos *et al.* (2008), donde se realizó un raspado de las estructuras de crecimiento del hongo (micelio y esporas) utilizando 20 mg de material en un tubo de 1,5 ml para ser macerado por medio de un pistilo plástico. Seguidamente se agregó 500 µl de buffer de extracción (200 mM de Tris-HCL pH=7,2, 50 Mm de EDTA, 3,0% de SDS, 1 M de NaCl) y se incubó durante 30 min con volteos cada 10 min a 60°C y se añadió un volumen de cloroformo (CHCl₃) y alcohol isoamílico (C₅H₁₂O) (24:1), mezclando por inversión hasta generar una emulsión. Esta solución se centrifugó durante 15 min a 1000 g, 4°C y luego se pasó a un tubo nuevo. Posteriormente se agregó 0,54 volúmenes de isopropanol según el sobrenadante extraído y se mezcló por inversión. Se almacenó el producto durante 15 min a una temperatura de -20°C.

Después se volvió a centrifugar durante 15 min a 1000 g y 4°C, descartando el sobrenadante y decantando el líquido. Se lavó el precipitado con 500 µl de etanol al 70%, con incubación a 37°C por 10 min. Luego se secó durante 10 min a 37°C con el tubo destapado y se resuspendió el precipitado en 300 µl de buffer TE 1X (Tris-EDTA). Luego, se le agregó la enzima ARNasa en una concentración de 1,0 µl por cada 50 µl de muestra y se incubó durante 60 min a 37°C, se agregó 0,1 µl de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) (0.3M pH=5,2) y dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar. Se volvió a centrifugar por 10 min a 3000 g, 4°C.

Finalmente se secó el precipitado al vacío y resuspendió en 50 µl de buffer TE 1X, centrifugado por 10 min a 3000 g, 4°C para ser transferido a un tubo nuevo. La confirmación de presencia de ADN se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (TBEX 1X) a 90 V por 30 min. Se cargaron 5,0 µl de ADN con 2,0 µl de buffer de carga 6X teñido con GelRed 1X, seguidamente las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta.

4.7.2. Amplificación por medio de PCR de la región *tef1*

Para la amplificación por medio de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se utilizó la metodología de Maharachchikumbura *et al.* (2012), está se basa en la amplificación parcial del factor de elongación 1-alfa (*tef1*). Esta región se amplificó con los cebadores EF1-526 F (5'-GTCGTYGTYATYGGHCA YGT-3') y EF1-1567 R (5'-ACHGTRCCRATACCACCRATCTT-

3'). La PCR se realizó con un volumen total de 25,0 µl por muestra que incluye 9,75 µl de agua destilada, 2,5 µl de buffer 10X DreamTaq Buffer, 2,5 µl de dNTP (0.2 mM), 2,0 µl de cada cebador (10 uM), 0,25 µl de Taq ADN polimerasa (5,0 U µl⁻¹) y 6,0 µl de ADN.

El desarrollo de los ciclos térmicos se estableció en una primera etapa de desnaturalización a 94°C por 5 min, una segunda etapa de 10 ciclos de 94°C por 30 s, 66°C por 55 s (decreciendo 1°C por ciclo) y 72°C por 90 s; una tercera de 36 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 55 s y 72°C por 90 s; y una cuarta etapa a 72°C durante 7 min. Asimismo, los productos de PCR se evaluaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1,0% (TBEX 1X) a 90 V por 60 min, con 5,0 µl de producto y 2,0 µl de buffer de carga 6X.

4.7.3. Secuenciación

Los productos de la PCR fueron enviados a la empresa Macrogen Inc., ubicada Corea del Sur. El resultado de las secuencias, se editaron con el programa BioEdit 7.7.1 y se compararon en la base de datos de Gen Bank por medio del BLAST.

4.8. Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron plantas de fresa de la variedad San Andreas, las cuales se obtuvieron a raíz desnuda, listas para la siembra, donde se utilizaron macetas plásticas de 15,0 cm de diámetro y 12,0 cm de altura.

Como sustrato se utilizó suelo, el cual se recolectó de una finca productora de fresa. El mismo se tamizó y se colocó en bolsas limpias para ser transportados al Laboratorio de Fitopatología. El suelo se sometió a un proceso de doble esterilización en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 psi, durante 20 min (Hattori *et al.*, 2015).

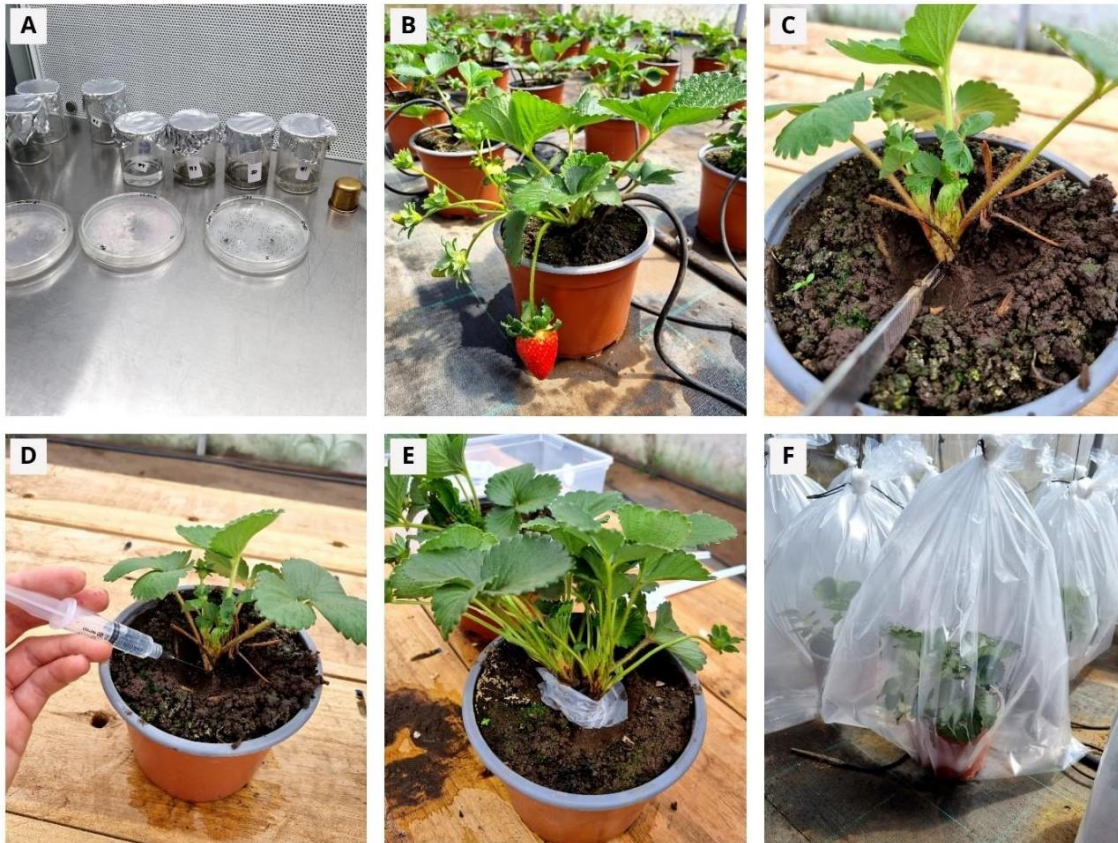
El ensayo se desarrolló en el invernadero de investigación de FESL, con un riego de 5 min todos los días en horas de la mañana. La fertilización se basó en el uso de fuentes sólidas de lenta liberación (fórmula 12-6-17-3,5-0,01-6,7(SO₄)-4 (CaO)-0,1 (ZnO)-8,7 (Materia orgánica)) siendo 5,0 g/planta, con aplicaciones de frecuencia de cada dos meses y aplicaciones foliares de multiminerales cada semana hasta la inoculación.

El proceso de inoculación se llevó a cabo según la metodología propuesta por Hidrobo (2020), Hemelrijck *et al.* (2016) y Rebollar *et al.* (2020), en el cual se realizó una herida de 0,5 cm con un bisturí esterilizado en la corona de las plantas con 90 días después de trasplante.

Luego las coronas se rociaron con una suspensión de conidios, la cual se preparó colocando 1,0 ml de agua destilada estéril sobre el medio de cultivo en desarrollo con el patógeno moviendo la superficie para la liberación de esporas. Luego, se filtró usando gasas para eliminar los trozos de micelio. Esta suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^{-6} UFC·ml⁻¹. Para las plantas control se desarrolló el mismo procedimiento anterior, con la diferencia que solo se aplicó agua destilada estéril. (Figura 3).

Figura 3

Procedimiento de inoculación de plantas de fresa.



Para la confirmación de las pruebas de patogenicidad se tomaron como muestra las plantas que mostraron la sintomatología descrita inicialmente para la enfermedad, llevándolas al

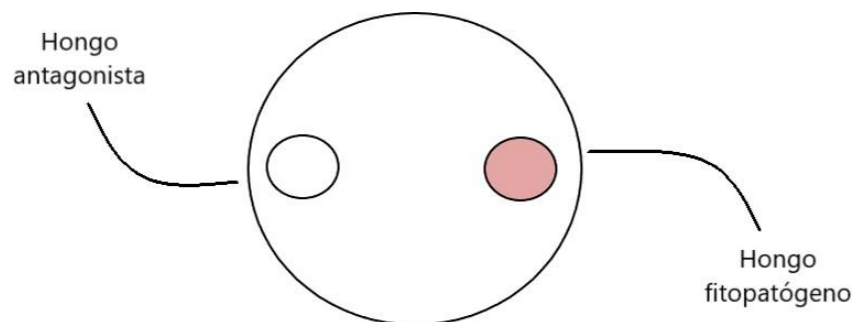
laboratorio para generar nuevos aislamientos y la comparar las características morfológicas de las colonias evaluadas en los aislamientos del campo. Estos se prepararon según el apartado de aislamientos y cultivos axénicos descritos anteriormente, con el propósito de completar los postulados de Koch y comprobar la patogenicidad (Rivera, 2018).

4.9. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Los ensayos de antagonismo se efectuaron por medio del desarrollo de la técnica de cultivos duales, utilizando medios de cultivo estériles de PDA. Esta técnica según Ramírez *et al.* (2013) se basa en el enfrentamiento de un hongo antagonista y un hongo fitopatógeno, los cuales se cultivaron purificados en placas Petri. Luego se realizó la colocación de un disco de aproximadamente 0,5 cm de diámetro de medio de cultivo de cada hongo con ayuda de un sacabocados estéril en cada extremo de una placa Petri nueva (Figura 4).

Figura 4

Conformación de una prueba de antagonismo por medio de la técnica dual enfrentamiento de un hongo antagonista y un hongo fitopatógeno



Para el ensayo se evaluaron tres aislamientos de hongos antagonistas (monospóricos). Se utilizaron aislados de los hongos antagonistas *T. asperellum* (TA), *T. viride* (TV) y *T. longibrachiatum* Rifai (TL) con cuatro días de desarrollo y aislamientos de los fitopatógenos con

siete días de desarrollo. Lo anterior debido a las diferencias en las tasas de crecimiento del fitopatógeno y el biocontrolador y de esta manera no dar ventaja competitiva al *Trichoderma*.

Para las cepas de *T. asperellum* y *T. viride* se evaluaron a los cuatro días (96 h) de iniciadas las pruebas duales. En cambio para *T. longibrachiatum* se evaluó a los tres días (72 h) por su rápido crecimiento en comparación a los demás aislamientos. Asimismo, las observaciones se extendieron hasta que los testigos fitopatógenos llegaran a su extensión máxima de crecimiento.

El control consistió en un solo disco de medio de cultivo con tejido fúngico correspondiente para cada hongo antagonista y hongo fitopatógeno. Todos los platos Petri se incubaron a una temperatura de 26 ± 2 °C en condiciones de oscuridad durante 10 días para el desarrollo de las colonias.

4.10. Evaluación de variables y diseño experimental

4.10.1. Incidencia y severidad

La incidencia y la severidad de la enfermedad se evaluaron desde las plantas de prueba de patogenicidad. Se determinó por medio de la fórmula de Castellanos *et al.* (2020), siendo necesarios el número de plantas que muestran síntomas característicos de la enfermedad de la pudrición de la corona.

$$\text{Incidencia (\%)} = (\text{Número de plantas con síntomas} / \text{Total de plantas}) \times 100$$

La evaluación de la severidad de la enfermedad se realizó empleando una escala visual de 5 grados (Tabla 6).

Tabla 6

Escala visual para medir la severidad de la pudrición de la corona en plantas de fresa

Grado	Síntomas observados
0	Planta sana (No presenta síntomas).
1	Ataque leve en la planta ($\geq 10\%$). El número de hojas atacadas es bajo y el ataque en cada hoja es pequeño. Puede presentar enanismo y clorosis.
2	Moderado ataque (11-25%). El número de hojas atacadas y el número de ataques en cada hoja es bastante alto. Puede presentar clorosis, marchitamiento en hojas y pudrición de raíz.
3	Muy atacada (26-50%). Número de hojas atacadas y número de ataques en cada hoja parecen grandes. Seguido de marchitez foliar. Necrosis interna del tallo y pudrición de raíces.
4	Planta muerta ($\leq 50\%$). Todas las hojas se marchitan y no hay signos de vida.

Fuente: Modificado de Bárcenas *et al.*, 2019; Widyaningsih & Triasih, 2021.

4.10.2. Competencia por sustrato y antibiosis

La comprobación de antagonismo se realizó midiendo tres variables: competencia por sustrato de acuerdo con la escala planteada por Bell *et al.* (1982)(Tabla 7); tiempo de contacto antagonista-patógeno y velocidad de colonización. Esta última, se midió en tiempo en horas transcurridos para que las colonias de los hongos entraran en contacto.

Tabla 7

Criterios para evaluar la categoría de antagonismo según ubicación del hongo antagonista sobre el hongo fitopatógeno

Categoría	Descripción
I	Antagonista colonizó toda la superficie de la placa Petri, reducción de fitopatógeno.
II	Antagonista colonizó ¾ partes de la placa Petri.
III	Antagonista y fitopatógeno colonizaron 50% de la placa Petri
IV	Fitopatógeno colonizó ¾ partes de la placa Petri.
V	Patógeno coloniza el total de la placa Petri.

Fuente: Bell *et al.*, 1982.

El efecto antibiótico que posee el hongo antagonista se midió por el porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC). La fórmula para este parámetro se siguió según la metodología planteada por Skidmore & Dickinson (1976).

$$\text{PCI (\%)} = [(C_1 - C_2) / C_1] \times 100$$

Donde: C1 = Crecimiento radial del fitopatógeno sin antagonista (Control). C2= Crecimiento radial del fitopatógeno en tratamientos duales.

4.10.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones por aislamiento, siendo los tratamientos de plantas inoculadas y plantas control (no inoculadas). La unidad experimental estuvo compuesta por una maceta de 1,0 kg, con suelo estéril con una planta de fresa.

Las pruebas de antagonismo estuvieron conformadas por cuatro repeticiones para cada hongo antagonista por cada hongo fitopatógeno, además, se contemplaron dos repeticiones para la evaluación control para cada cepa de *Trichoderma*. La unidad experimental consistió en una

placa Petri con PDA con dos discos de tejido fúngico según corresponda. Las mediciones se realizaron cada 24 horas, por un periodo de tiempo de 10 días.

4.11. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las pruebas de antagonismo (PIC), junto con la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas y prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$) con el programa estadístico R-Studio 2024.04.01.

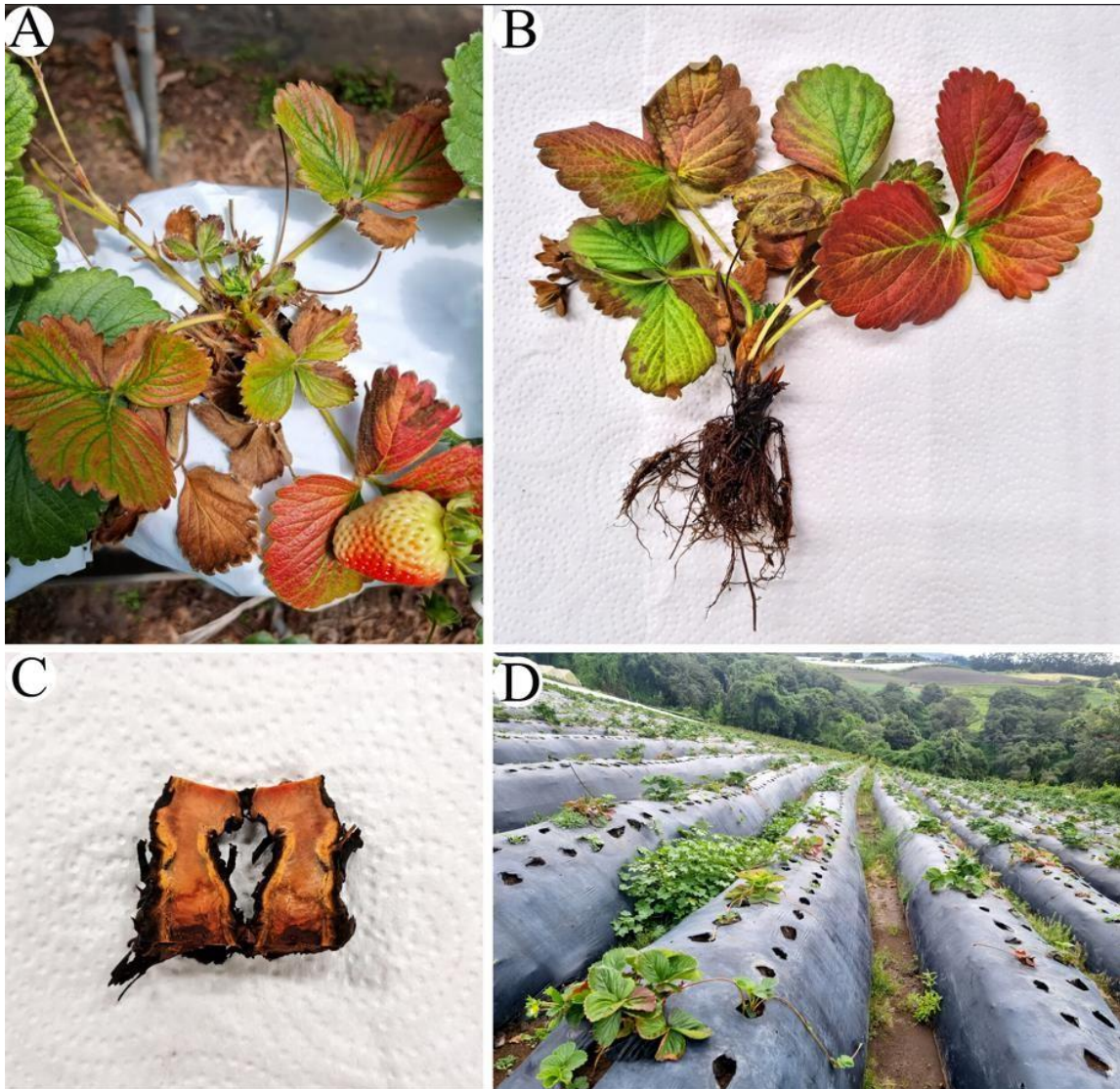
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Sintomatología e incidencia

Los síntomas observados en las plantas de fresa, se codificaron NEO-A4, NEO-B1 y NEO-B6 (Llano Grande de Cartago), NEO-C3, NEO-C5, NEO-D1 y NEO-D5 (San Pedro de Poás) y NEO-E5 (Vásquez de Coronado). Las plantas muestreadas en las tres localidades mostraron características comunes de la enfermedad de la muerte descendente de la corona, destacando principalmente el desarrollo de coloraciones oxidadas marrones y magentas en los bordes de los folíolos de las hojas más viejas, con la formación de lesiones necróticas generalizadas conforme el avance del área de afectación en el tejido. En las hojas nuevas se observó una disminución del crecimiento (enanismo) y temprana necrosis en los bordes, siendo en infecciones severas marchitamiento generalizado (Jiménez-Madrid *et al.*, 2024) (Figura 5).

Figura 5

Sintomatología general de la enfermedad de la podredumbre de la corona en plantas de fresa. Marchitamiento y necrosis de hojas (A y C). Necrosis de corona (B). Pérdidas de plantas en campo (D)



Por parte del área vascular, las coronas evidenciaron una obstrucción por daño necrótico de coloración marrón naranja en los bordes y centros en estados evolucionados (Essa *et al.*, 2018). También se evidenció un estado radicular pobre, envejecido y afectado con lesiones necróticas segmentadas cerca de su área basal.

La misma sintomatología descrita anteriormente fue reportada por Ara *et al.* (2017) dónde indicaron que las manchas marrones iniciales en los bordes de las hojas viejas avanzan hacia las hojas jóvenes donde generan una marchitez de las estructuras como flores y brotes nuevos. Asimismo, destaca la aparición de hojas con coloraciones magentas. Por otra parte, Rebollar-Alviter *et al.* (2020) describen el complemento de los síntomas con apariciones de lesiones necróticas marrones en la corona de las plantas y en el medio de los peciolos.

En cuanto a la incidencia de la podredumbre de la corona de planta de fresa, se determinaron variaciones en las distintas localidades muestreadas. En la zona de San Pedro de Poás se determinaron niveles de 16,67% y 24,50% para los lotes de mayor afectación. En la zona de Llano Grande, donde las fincas muestreadas poseen lotes de mayor número de plantas, se obtuvo valores de 11,67% y 25,33%, siendo este último, el de mayor de todos los lotes muestreados y para el área de Vázquez de Coronado el lote analizado mostró una incidencia de 14,81% (Tabla 8).

Tabla 8

Incidencia de la enfermedad de podredumbre de la corona de fresa según localidad, finca y lote analizado

Localidad	Identificación de aislamientos	Cantidad plantas totales lote	Cantidad plantas con síntomas	Incidencia (%)
Llano Grande Cartago	NEO-A4	60.000	7.000	11,67%
	NEO-B1 NEO-B6	30.000	7.600	25,33%
San Pedro Poás	NEO-C3 NEO-C5	6.000	1.000	16,67%
	NEO-D1 NEO-D5	4.000	980	24,50%
Vásquez de Coronado	NEO-E5	5.400	800	14,81%

En comparación a los diferentes reportes de incidencia a nivel internacional, estos valores muestreados son menores a los registrados. De acuerdo con Rebollar *et al.* (2020) en algunas zonas de México se han observado valores de hasta un 40 a 50% de pérdidas de plantas considerando un aumento conforme pasan los años. En el área de Florida en Estados Unidos de América, en el año 2018 los brotes de la enfermedad se propagaron, por lo que fue necesario eliminar 35 ha de cultivo de fresas a media temporada y 15 ha al final de la temporada (Baggio *et al.*, 2021).

Las variaciones entre las incidencias obtenidas pueden ser causadas por diversos aspectos epidemiológicos de los patógenos asociados que inciden en el nivel de daño, nivel de agresividad de los aislamientos, al igual que el manejo de las plantaciones, inocuidad de la semilla, grado de

resistencia o tolerancia y condiciones edafoclimáticas (Baggio *et al.*, 2020). En las condiciones edafoclimáticas radica la sustitución de modelos de cultivo tradicionales, en los cuales se establece el cultivo en lomos de suelo, a modelos hidropónicos, en que se utilizan distintos materiales inertes para permitir el crecimiento y sostén de las raíces. Esta sustitución disminuye la cantidad problemas a nivel fitosanitario al ser sustratos libres de contaminaciones de hongos, bacterias y nemátodos (Ibadango, 2017).

Asimismo, los factores medioambientales como la temperatura y la humedad están directamente relacionados con la incidencia de enfermedades. El estrés hídrico en el cultivo de fresa muestra una mayor afectación en la podredumbre de la corona, ya que la afectación de patógenos en las estructuras vasculares imposibilita un eficiente proceso de traslocación de nutrientes y agua a todas las áreas de la planta (Pastrana, 2014). En cuanto a la humedad, los excesos facilitan las condiciones de diseminación y desarrollo de estructuras reproductivas.

Con relación a este tema, Ibanez *et al.* (2023) encontraron mayores porcentajes de incidencia al comparar sistemas productivos de fresa desarrollados en microtúnel y macrotúnel para esta enfermedad. Además, determinaron la existencia de variedades de fresa más susceptibles a los ataques de fitopatógenos vasculares. En las localidades muestreadas estos factores ejercen una mayor presión al momento de la entrada de la época seca, donde la disponibilidad de agua baja y en la época lluviosa en la entrada de las lluvias.

La calidad de la semilla es clave para el establecimiento de plantaciones. En todas las fincas muestreadas se utilizaron plantas importadas desde viveros dedicados a la reproducción de plantas de fresa en España. Este es un aspecto importante, ya que se ha reportado la sintomatología de la enfermedad de la pudrición de la corona en países dedicados a la exportación de plantas, como Estados Unidos (Baggio y Peres, 2020), Argentina (Obregón *et al.*, 2018), México (Morales *et al.*, 2019) y España (Chamorro *et al.*, 2016), lo cual posibilita el ingreso de fitopatógenos al país.

Otro de los factores que puede variar la incidencia de la enfermedad es el manejo dado a la plantación ya que los tratamientos de control de fitopatógenos pueden disminuir la cantidad de inóculo presente en el campo. Para enfermedades policíclica como la aquí descrita, cada planta (hospedante) enferma tiene el potencial de actuar como fuente de inóculo para propagar y diseminar a las plantas adyacentes de fresa durante la misma etapa fisiológica. La podredumbre

de la corona sigue un modelo logístico de propagación que incluye una fase exponencial de propagación, seguida de una curva de saturación a medida que las plantas hospedantes se vuelven más limitantes o que pasó su etapa crítica de susceptibilidad (Gilbert & Parker, 2023).

En las fincas muestreadas en la localidad de Llano Grande desarrollan prácticas con el uso del ozono, el cual es capaz de disminuir los hongos fitopatógenos del suelo causantes de la enfermedad de secadera en fresa (Bucio *et al.*, 2016).

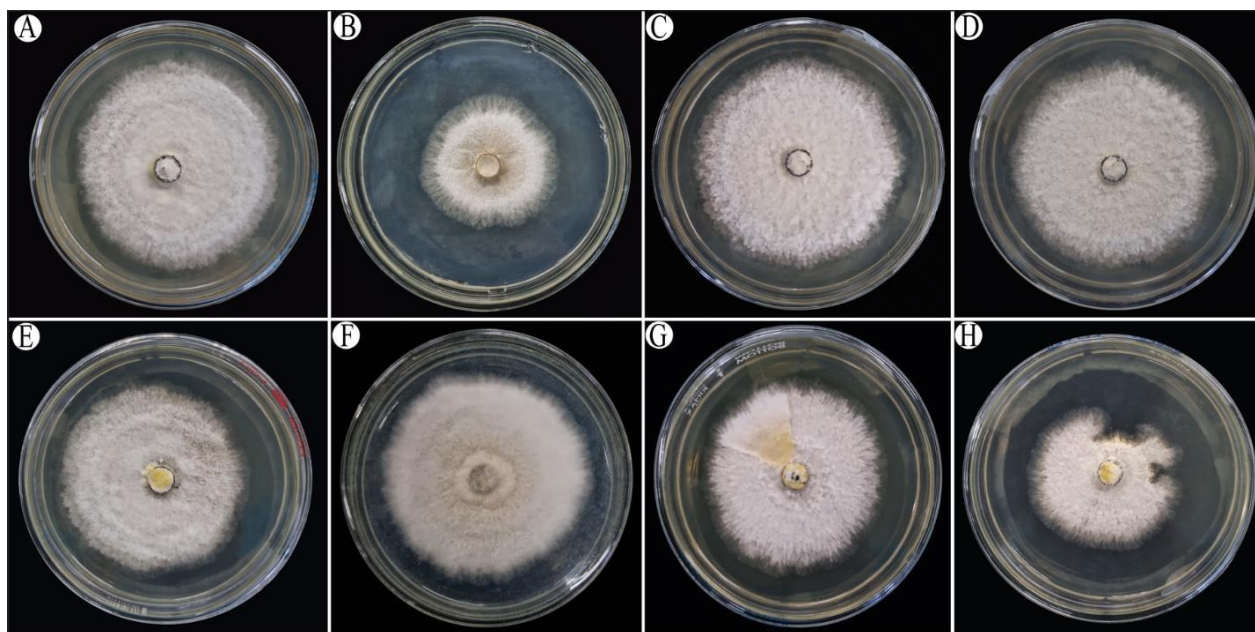
5.2. Identificación y caracterización morfológica de los aislados

Los caracteres morfológicos y las características de las colonias de los 8 aislados obtenidos de la corona de fresa, se muestran en la Figura 6.

En medio de cultivo PDA, las colonias de los 8 aislados mostraron crecimiento denso, de color blanco, sin importar el lugar de origen. La textura de estos fue algodonosa, destacando el caso de los aislamientos NEO-A4, NEO-B6 y NEO-D5 que desarrollaron abundante crecimiento aéreo y presentaron la formación de acérvulos de color oscuro. En todos los aislamientos se determinó la presencia de micelio septado, el cual conforme a su maduración fue tomando coloraciones amarillentas en su parte inferior.

Figura 6

Colonias de los hongos aislados con 7 días de crecimiento en PDA, aisladas de tejido de la corona de fresa. Muestras NEO-A4 (A), NEO-B1 (B), NEO-B6 (C) NEO-C3 (D), NEO-C5 (E), NEO-D1 (F), NEO-D5 (G) y NEO-E5 (H)



Al momento de maduración de las colonias, el desarrollo de estructuras reproductivas se evidenció a los 30 días de desarrollo en algunas de ellas, con la formación de acérvulos. Estos mostraron una coloración traslúcida inicial y posteriormente coloración negra, además de una textura acuosa. Cabe resaltar que los aislamientos NEO-A4, NEO-B6, NEO-C3 y NEO-D5 mostraron una producción de acérvulos alta; sin embargo, en los aislamientos NEO-B1, NEO-C5, NEO-D1 y NEO-E5 hubo una producción de acérvulos baja. Esta variabilidad ha sido observada y descrita dentro en el cultivo de fresa (Acosta, 2022).

Las características de colonia y cuerpos fructíferos desarrollados por los aislamientos concuerdan con diversos estudios. Los aislamientos descritos por Chamorro *et al.*, (2016) indican el desarrollo de colonias blancas de textura algodonosa, crecimiento de acérvulos oscuros que contenían conidios fusiformes rectos formados por cinco células, las cuales en posición apical poseían entre dos a cuatro apéndices. De igual forma Morales *et al.*, (2019) reportaron colonias con formación de acérvulos que iniciaban con una coloración hialina y amarillos, los cuales a medida que maduraban, se fueron oscureciendo.

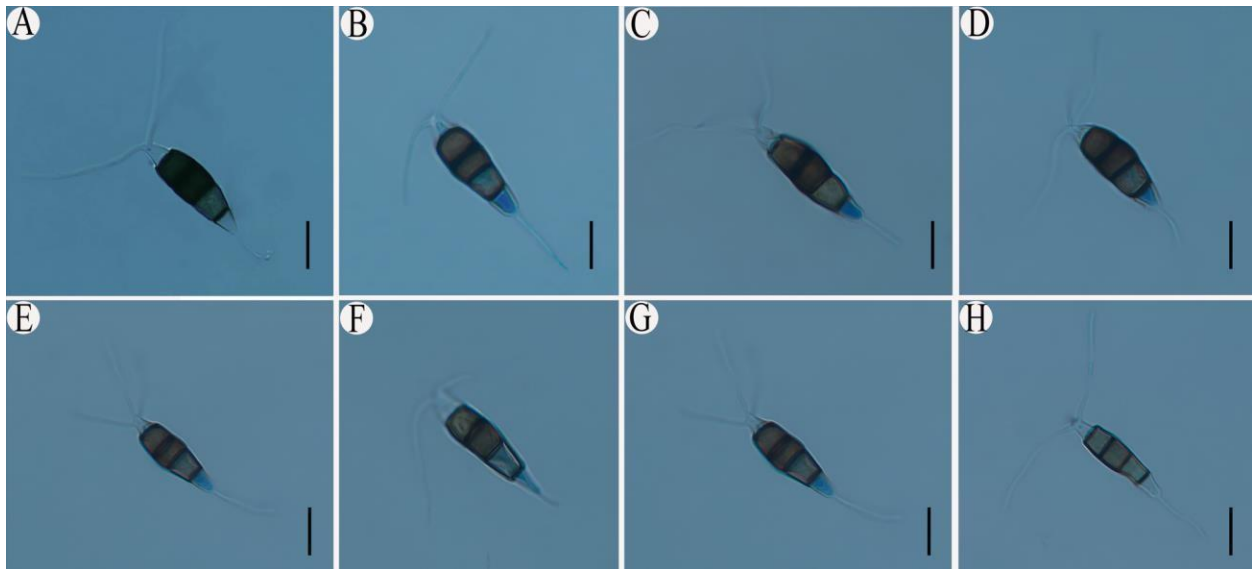
Los resultados de la caracterización morfológica conidial presentaron presencia de conidios, lo cuales se caracterizaron por tener una forma fusiforme, por cinco células. Las dos células terminales eran hialinas y las tres células internas poseen coloraciones marrones claras. Asimismo, estos se distinguían por la presencia de apéndices de consistencia hialina,

dividiéndose en apicales largos con dos a tres estructuras y basales generalmente uno (Darapanit *et al.*, 2021) (Figura 7).

Asimismo, Bhagariya y Prajapati (2019) al analizar la enfermedad de pudrición de corona en fresa, encontraron en los aislados la presencia de conidios de cinco células, donde las células de los extremos eran hialinas y las células medias presentaban tonalidades marrones a negras. Esta misma particularidad fue observada por Hidrobo (2020) donde los septos centrales de los conidios poseían una coloración café a oliva. Otros investigadores como Shi *et al.*, (2021) y Sigillo *et al.*, (2020) mencionan estas mismas características de colonias y conidios en aislamientos de la corona de fresa que son característicos.

Figura 7

Conidios de los aislados formados en medio PDA . Observados a 100X. Muestras NEO-A4 (A), NEO-B1 (B), NEO-B6 (C) NEO-C3 (D), NEO-C5 (E), NEO-D1 (F), NEO-D5 (G) y NEO-E5 (H)



En cuanto a crecimiento de las colonias, el diámetro al séptimo día de evaluación fue de 55,34 mm como promedio, en el intervalo máximo y mínimo se dio en el aislamiento NEO-B1 (41,75 mm) y NEO-C5 (63,75 mm). Para la tasa de crecimiento estos obtuvieron un promedio de 8,09 mm.día⁻¹, con crecimientos lentos en los aislamientos NEO-B1 (6,00 mm.día⁻¹) y NEO-E5 (6,88 mm.día⁻¹). El crecimiento más rápido se presentó en los aislamientos NEO-C5 (9,50 mm.día⁻¹) y NEO-D5 (90,8 mm.día⁻¹), respetivamente (Tabla 9).

Según los diámetros de crecimiento obtenidos por Lazarotto *et al.* (2014) cultivados en PDA a 25°C, se alcanzaron promedios entre los 53,43 mm a 65,47 mm, en comparación a resultados conseguidos en este estudio donde los aislamientos NEO-B1, NEO-D1 y NEO-E5 presentaron poco desarrollo. De igual forma, las tasas de crecimiento evidenciaron valores similares a los obtenidos en ese estudio.

Contrario a este resultado, los valores analizados por Vallejo (2021) en aislamientos patógenos de corona de fresa del género mostraron tasas de crecimiento mucho menores (5,29 mm.día⁻¹ y 4,19 mm.día⁻¹) a las obtenidas, por lo que los aislamientos logrados mostraron una alta capacidad de crecimiento bajo las condiciones realizadas de este estudio. Las diferencias en crecimiento podrían estar relacionadas a variaciones en la composición de los medios de cultivo o condiciones ambientales de desarrollo, ya que la temperatura adecuada para el crecimiento de hongos de este género es de 22° a 23°C en medio PDA y un fotoperiodo de 12 horas luz (Solarte *et al.*, 2018)

En tanto a las dimensiones de conidios, como conjunto, todos los aislamientos mostraron valores entre 38,28 a 21,40 µm (28,65 µm) de largo y 10,95 a 5,78 µm (8,26 µm) de ancho. El aislamiento NEO-C5 demostró las mayores medidas de largo (31,78 µm) y ancho (9,49 µm), en cambio el aislamiento C3 fue el que demostró menor largo (25,44 µm), pero un ancho promedio. El aislamiento NEO-E5 presentó el ancho más bajo (6,89 µm) siendo particular las proporciones evidenciadas (Figura 7). La cantidad de células por conidio y cantidad de apéndices fue un parámetro estable para todos los aislamientos, cinco células y dos a tres estructuras como se discutió anteriormente (Tabla 9).

En contraste a las dimensiones de los conidios descritos, estos mostraron similitud con estudios realizados por Machín *et al.*, (2019) para aislamientos en su primer reporte en Uruguay, donde señalan medidas comparativas de 25,50 µm largo y 6,50 µm de ancho. También Chamorro *et al.*, (2016) reportaron valores de medias de los conidios de 22,70 µm y 7,70 µm de aislados del cultivo de fresa. Otros estudios muestran dimensiones de conidios de largo entre 25,12 a 32,12 µm y ancho de 5,60 a 7,88 µm (Lazarotto *et al.*, 2014).

Tabla 9

Características morfológicas y culturales de los aislados de hongos en PDA obtenidos de la corona de fresa en este estudio

Aislamiento	Diámetro (mm) ⁽¹⁾	Tasa crecimiento micelial (mm por día) ⁽²⁾	Conidios			
			Largo (µm)	Ancho (µm)	Número de células	Número de apéndices
NEO-A4	58,50	8,54	30,60	8,25	5	2-3
NEO-B1	41,75	6,00	27,82	8,16	5	2-3
NEO-B6	56,50	8,29	29,31	8,28	5	2-3
NEO-C3	60,00	8,83	25,44	8,41	5	2-3
NEO-C5	63,75	9,50	31,78	9,49	5	2-3
NEO-D1	50,50	7,58	28,90	8,93	5	2-3
NEO-D5	63,00	9,08	29,21	7,70	5	2-3
NEO-E5	48,75	6,88	26,18	6,89	5	2-3

⁽¹⁾Diámetro de la colonia al séptimo día.

⁽²⁾Tasa de crecimiento micelial diaria de la colonia calculado al día de la evaluación final.

Las características de los aislamientos reportados en el presente estudio permitieron realizar la identificación morfológica a nivel de género. Todos los aislados obtenidos pertenecen (Ascomycota, Amphisphaeriales, Sporocadaceae) (Hsu *et al.*, 2024). Sobre la especie, no fue posible identificarla a nivel morfológico, debido a la dificultad de asociación de características morfológicas con determinadas especies, las cuales en el pasado se diferenciaban en género por la ausencia de coloración de las células medias de los conidios (Solarte *et al.*, 2018; Elkhateeb & Daba, 2021). Por esta razón se debió realizar el análisis molecular respectivo para su caracterización.

La utilización de caracteres morfológicas para la identificación de especies como el diámetro de la colonia, tamaño de conidios, número de células, posición y longitud de los

apéndices, son importantes para una adecuada caracterización. Sin embargo, la presencia de factores externos o dificultades al momento de observar estructuras recuerdan que la mejor forma de identificación de especies de este género es el uso de análisis filogenéticos (Elkhateeb & Daba, 2021; Lazarotto *et al.*, 2014).

5.3. Identificación molecular

A partir de los resultados de los análisis moleculares de los productos de PCR, se determinó la identificación del patógeno para todos los aislamientos. Estos resultados concuerdan con la identificación morfológica realizada previamente.

En relación con el análisis de similitud de especies, por medio del BLAST (Genbank-NCBI), los hongos aislados de Llano Grande, San Pedro Poás y Coronado mostraron una identidad de 99,38% a 100,00% en coincidencia con la accesión KU096881.1 (Tabla 10).

Tabla 10

Identificación molecular y análisis de similitud de los aislados de hongos causantes de la podredumbre de la corona de fresa

Aislamiento	Identificación	Pares de bases	Análisis de similitud	N° de accesión
NEO-A4		979	99.38%	
NEO-B1		980	99.38%	
NEO-B6		982	99.58%	
NEO-C3		983	99.90%	
NEO-C5		982	99.69%	
NEO-D1		980	99.48%	
NEO-D5		982	100.00%	
NEO-E5		985	99.79%	

Es importante destacar que en otros estudios para la identificación de este patógeno se han realizado análisis de distintas regiones de amplificación como la TEF, ITS y β -tubulina. Maharachchikumbura *et al.* (2012) y Baggio *et al.* (2021) mencionan que estas dos últimas no delimitan con tanta precisión algunas de las especies de este género, lo que puede hacer caer en confusión los resultados. Asimismo, otros autores como Solarte (2014) y Acosta (2022) recomiendan el uso de múltiples regiones; no obstante, ya se han obtenido resultados precisos utilizando solo la región TEF parcialmente como en el estudio en plantas de fresa en Uruguay (Machín *et al.*, 2019).

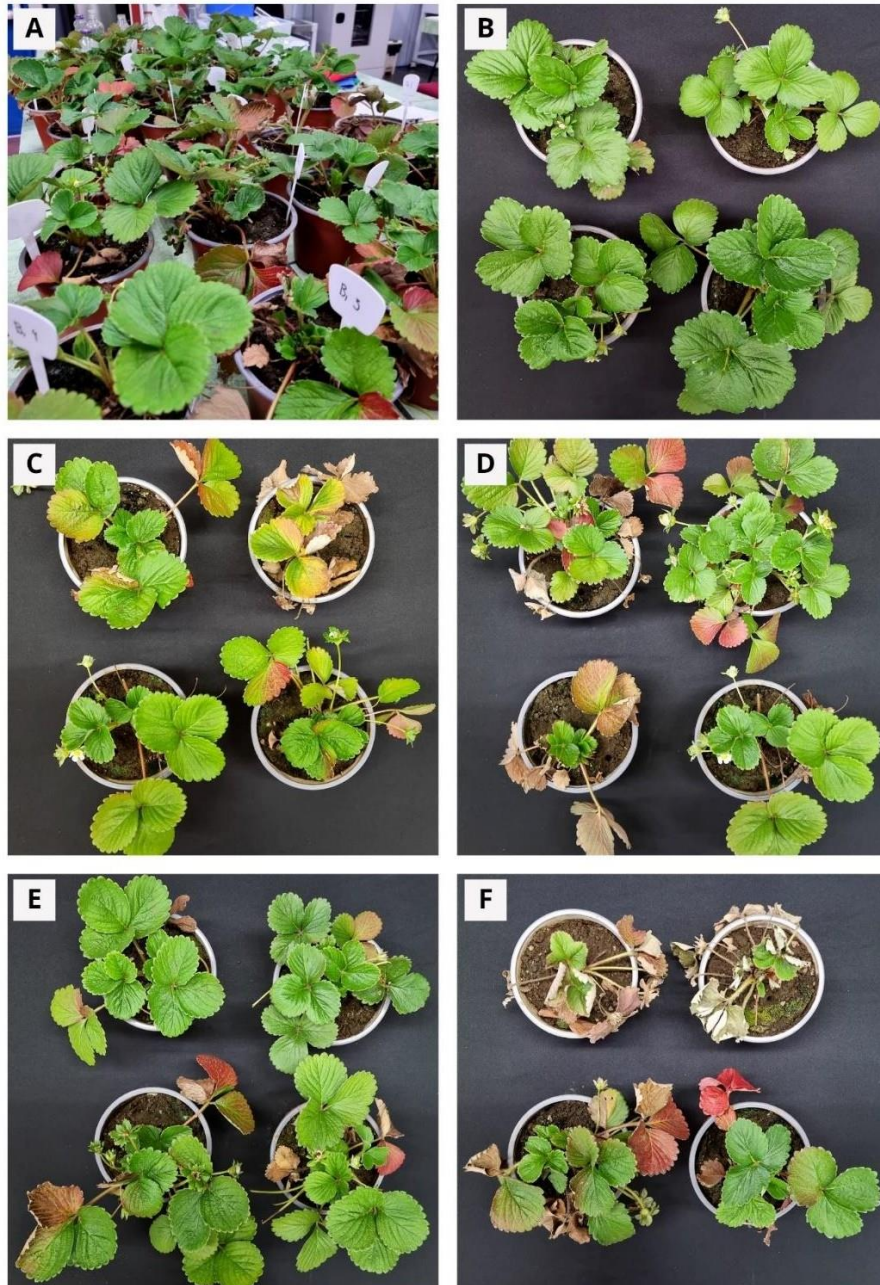
Tanto los resultados morfológicos como los moleculares son claros en la identificación de como el agente causante de la podredumbre de la corona en plantas de fresa. Esto destaca la similitud del problema en las plantaciones muestreadas. Estos resultados son congruentes, ya que todas las plantaciones tienen en común el mismo origen de la semilla, que es específicamente España. Por lo tanto, es de esperar la introducción de este patógeno por medio de plantas afectadas. El uso de material reproductivo y siembra debe ser seleccionado apropiadamente, considerando desde las características climáticas hasta la sanidad y requisitos fitosanitarios al momento de su importación o multiplicación (Interamericano de Cooperación para la Agricultura (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA] *et al.*, 2017).

5.4. Pruebas de patogenicidad

De las plantas utilizadas para las pruebas de patogenicidad para cada aislamiento en su totalidad demostraron síntomas asociados a la enfermedad de la podredumbre de la corona a los 35 días posteriores de la inoculación. Las plantas testigo permanecieron libre de la enfermedad (Figura 8).

Figura 8

Sintomatología de la pudrición de la corona en plantas de fresa cv. San Andreas, resultado de la prueba de patogenicidad de diferentes aislados. (A). Muestra control (B), NEO- A4 (C), NEO-B1 (D), NEO-B6 (E), NEO-C3 (F), NEO-C5 (G), NEO-D1 (H), NEO-D5 (I), NEO- E5 (J)





Los resultados de las pruebas de patogenicidad confirmaron que es la especie responsable de causar la podredumbre de la corona y muerte de las plantas en las zonas de estudio. Los síntomas expresados por las plantas fueron marchitez y clorosis de las hojas externas (más antiguas) tomando coloraciones magenta y marrones hasta llegar al marchitamiento con necrosis en sus folíolos (Figura 9). Por parte de los aislamientos NEO-A4, NEO-B1 y NEO-C3 mostraron coloraciones rojizas en los peciolo de las hojas más afectadas. Todas las plantas tuvieron ataques del patógeno a nivel de la corona con manchas de coloración marrón naranja, además de mostrar parte de las raíces con coloraciones oscuras y blancas.

Figura 9

Síntomas de la podredumbre de corona en plantas de fresa inoculadas . (A y C) Marchitez y clorosis. (B) Necrosis de corona



En tanto a la severidad, el aislamiento NEO-C3 demostró un mayor nivel de afectación en comparación a los demás aislamientos, con plantas muy dañadas a nivel de corona y raíces necrosadas hasta llegar a la muerte (grados 3 y 4 según la escala utilizada). Los aislamientos NEO-A4, NEO-B1 y NEO-D5 presentaron moderados ataques, con marchitez y clorosis generalizada entre las hojas solamente, pero aun así con afectaciones vasculares. Para los aislamientos NEO-B6, NEO-C5, NEO-D1 y NEO-E5 las afectaciones permanecieron leves, con presencia de enanismo en su crecimiento. Los menores síntomas a nivel foliar los presentaron las plantas inoculadas con el aislamiento NEO-C5; no obstante, siempre evidenciaron daño en la corona.

La virulencia de los aislados de las diferentes especies de causantes de enfermedades en fresa pueden variar considerablemente, producto de distintos factores como el cultivar, la condición nutricional de la planta, la humedad, la temperatura, así como la cantidad de inóculo (Acosta, 2022). Es necesario en futuras investigaciones, determinar el potencial de

virulencia de los aislados en los diferentes cultivares de fresa utilizados en Costa Rica y así determinar cuáles presentan algún grado de tolerancia a este patógeno.

La virulencia de diversos patógenos fúngicos y oomicetos asociados a enfermedades de la corona y de raíz de la fresa está fuertemente influenciada por el régimen de temperatura estacional predominante. Esto se relaciona con el predominio de estos patógenos en los meses más cálidos del año (Fang *et al.*, 2011).

Estas diferencias entre el grado de afectación de los aislamientos a las plantas pueden ocurrir por influencia de factores abióticos. Según Aguilera (2023) los daños causados por son más evidentes en plantaciones que se encuentran al aire libre, es decir, más expuestas a la humedad. Asimismo, destaca las temperaturas ideales para su desarrollo, las cuales oscilan entre los 19° a 23°C con libre disponibilidad de agua. No obstante, las condiciones experimentales realizadas aseguraron la presencia de humedad en el ambiente al cerrar las plantas en bolsas plásticas herméticas y temperaturas promedio en el área de estudio durante el proceso de infección.

A partir del tejido vegetal infectado de la corona que presentaba síntomas de la enfermedad, se realizaron nuevos aislamientos para completar los postulados de Koch (Martino *et al.*, 2024). Estos demostraron las mismas características morfológicas de los aislados obtenidos inicialmente, con la conformación colonial con tejido algodonoso, coloración blancusca y estructuras reproductivas en forma fusiforme. Lo anterior permitió determinar a los aislados obtenidos como agentes causales de la enfermedad de la podredumbre de corona de fresa según las condiciones de este estudio.

Desde el primer reporte de este patógeno por Chamorro *et al.* (2016) en España, en otros países se han realizado estudios para su identificación. En Italia Sigillo *et al.* (2019) reportaron síntomas de esta enfermedad a nivel de corona en su totalidad a los 2 meses de realizada la inoculación, junto con un retraso significativo en el crecimiento foliar, similar a los resultados de este estudio.

Otros países en donde se ha reportado patogenicidad han sido Uruguay (Machín *et al.*, 2019), China (Shi *et al.* 2021), Argentina (Obregón *et al.*, 2018) y Corea del Sur (Park *et al.*, 2019), donde reportan lesiones necróticas a nivel interno de la corona en las plantas luego de hacer la inoculación.

. En pruebas de patogenicidad realizadas por realizadas por estos dos autores, determinaron que

los síntomas comenzaron a iniciar a los 8 días en hojas y a los 20 días en corona posteriores a la inoculación. También en evaluaciones realizadas por López (2021) determinó la presentación de síntomas en la parte aérea luego de 19 días de inoculación y colapso de plantas a partir de los 35 días.

De igual manera, este hongo ha reportado patogenicidad con síntomas de podredumbre de tallos en otros cultivos como el arándano, siendo de similares las lesiones con formación de canchales de coloración marrón rojiza (Borrero *et al.*, 2018). También existe el reporte de patogenicidad en otros cultivos de conformación más leñosa como mango (*Mangifera indica* L.) (Gerardo-Lugo *et al.*, 2020; Ismail *et al.*, 2013), macadamia (*Macadamia integrifolia*) (Santos *et al.*, 2019), palma datilera (*Phoenix dactylifera*) (Basavand *et al.*, 2020), té (*Camellia sinensis*) (Shahriar *et al.*, (2022), marañón (*Anacardium occidentale* L.) (Rajashekara *et al.*, 2023), mangostán (*Garcinia mangostana*) (Zhu *et al.*, 2023) y caucho (*Hevea brasiliensis*) (Solpot *et al.*, 2024).

5.5. Pruebas de antagonismo *in vitro*

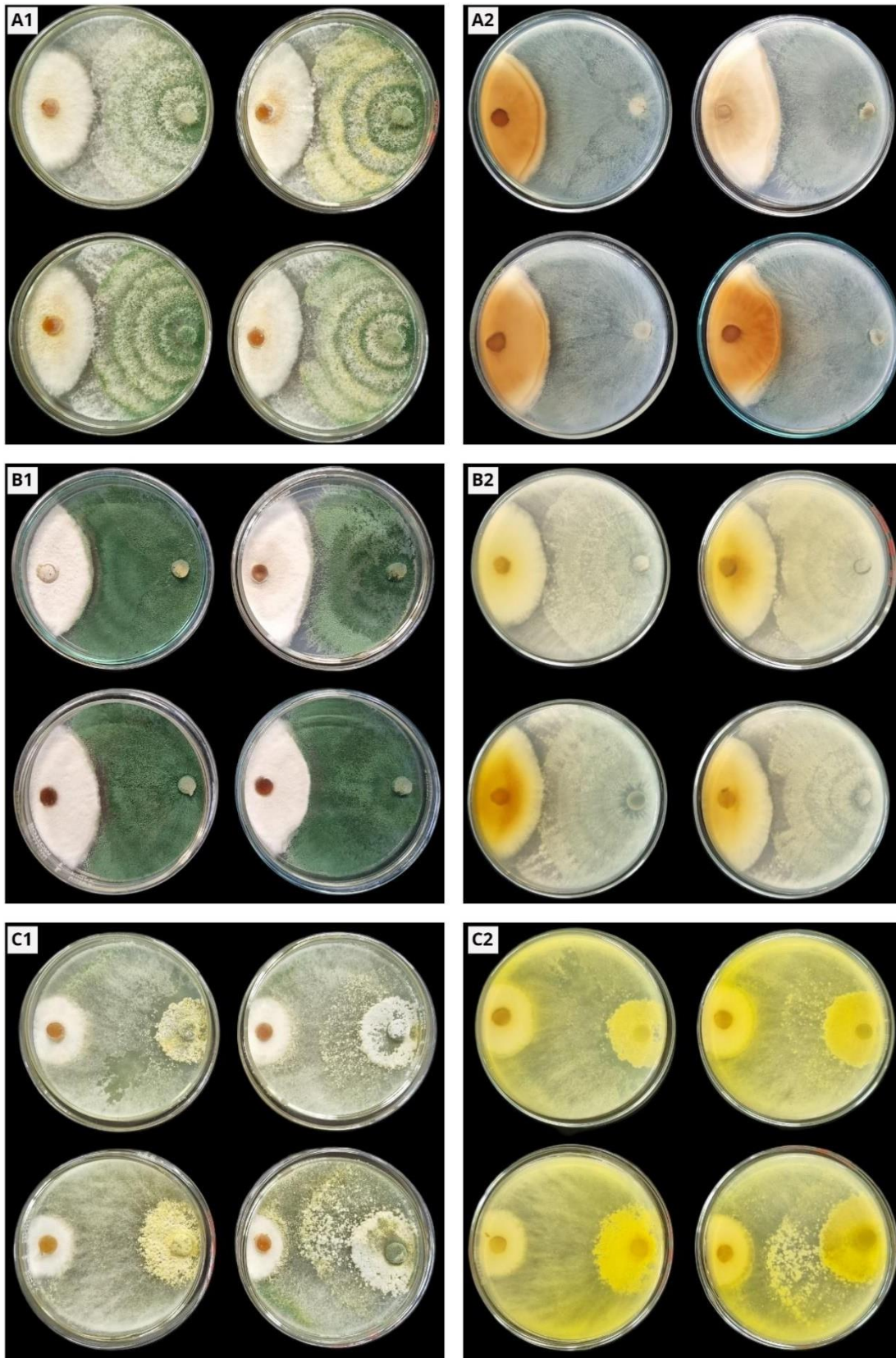
Los resultados de las pruebas de cultivo duales, permitió evaluar el grado de antagonismo de *T. asperellum* (TA), *T. viride* (TV) y *T. longibrachiatum* (TL).

5.5.1. Evaluación de competencia por sustrato y tiempo de contacto

De acuerdo con la escala de Bell *et al.* (1982) para la evaluación de competencia de sustrato, en todas las evaluaciones realizadas según especie de *Trichoderma* y aislado del patógeno, el antagonista ocupó un 75% de la placa Petri donde crecían. Es decir, que el antagonista logró sobrepasar dos terceras partes de la superficie de medio de cultivo, lo cual se clasifica en la clase II. Esto comprueba la competencia por sustrato de *Trichoderma* spp. ante el patógeno al mostrar una competición superior al 50% (Figura 10).

Figura 10

Pruebas de cultivo duales de (A) *T. asperellum*, (B) *T. viride* y (C) *T. longibrachiatum*.
Crecimiento en PDA al sexto día. Anverso (A1, B1, C1). Reverso (A2, B2, C2)



Estudios realizados por Acosta (2022) dónde evaluó la capacidad antagónica de aislamientos de *Trichoderma* spp. determinó una clase II para tres cepas por competencia de sustrato. Cabe destacar el resultado que obtuvo de otras dos cepas analizadas, las cuales lograron una colonización completa de la placa Petri, cubriendo totalmente al patógeno. Asimismo, en trabajo sobre antagonistas de patógenos en fresa, Sánchez (2019) determinó, que todas las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas tuvieron un desarrollo total dentro de la superficie, por lo que les asignó una clase I.

Esta competencia por sustrato o nutrientes evidencia que las especies de *Trichoderma* evaluadas en este estudio y su rápido crecimiento son antagonistas. Sobre este tema, Grados (2024) menciona que este antagonista es muy efectivo debido a su velocidad de crecimiento y a la secreción de metabolitos. En este caso, las especies *T. asperellum* y *T. viride* destacan por tener una alta capacidad antagónica hacia otros microorganismos (Amuza & Zaharia, 2022).

Al medir el tiempo de contacto, para todas las evaluaciones de los aislamientos de *T. asperellum* y *T. viride* obtuvieron un tiempo de 96 h para interactuar directamente con las colonias. En el caso del aislamiento de *T. longibrachiatum* las colonias de este hongo llegaron a realizar contacto un día antes que las otras especies, es decir a las 72 horas.

Con respecto a *T. longibrachiatum*, logró hacer contacto a las 72 h. Resultados similares fueron obtenidos por Acosta (2022) quien determinó que a las 72 h el tiempo de contacto entre diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y aislados de patógenos. Esta característica de tiempo de contacto fue observada por Calvo-Araya *et al.*, (2012) los cuales mencionan que menores tiempos describen una buena capacidad antagónica. El estudio de Namen *et al.* (2023) y sus opciones de control biológico con el uso de cepas de *Trichoderma* spp., dónde se utilizó específicamente *T. asperellum*, determinó tiempos de contacto entre las 48 y 60 horas. Estos resultados detallan como altamente antagonistas a las cepas evaluadas y porcentajes muy altos de inhibición de crecimiento.

5.5.2. Evaluación de antibiosis

Al analizar los resultados de las pruebas de crecimiento dual, todos los aislamientos de *Trichoderma* utilizados lograron influir en el crecimiento sobre los aislados en

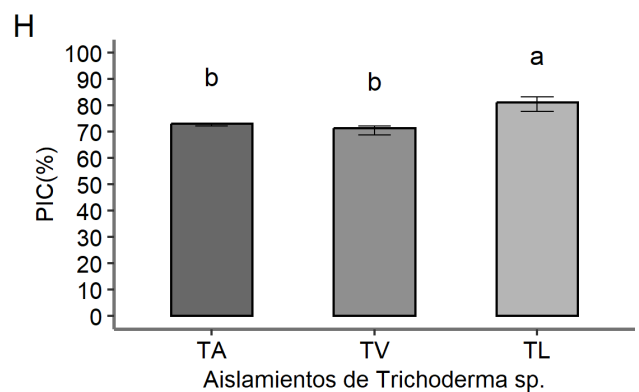
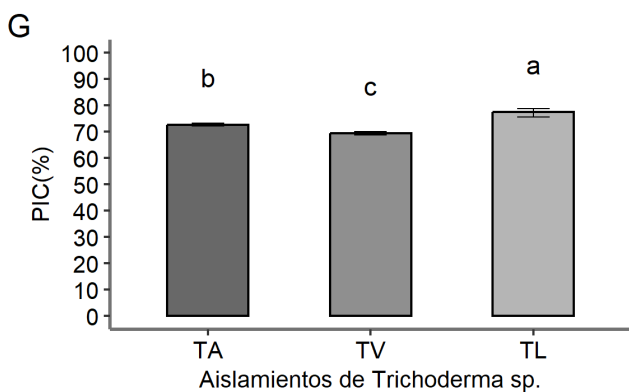
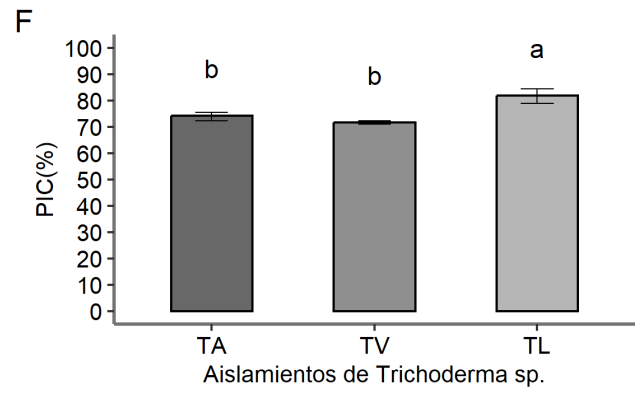
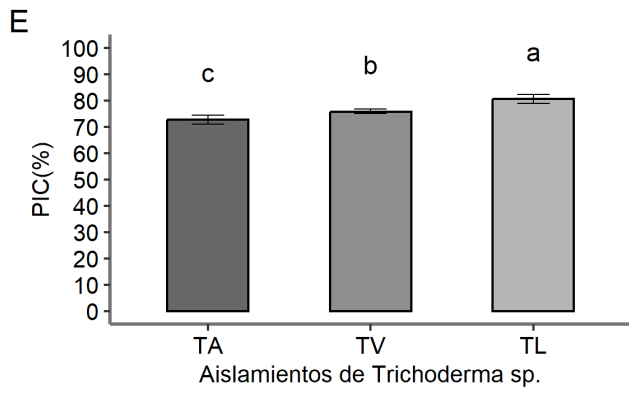
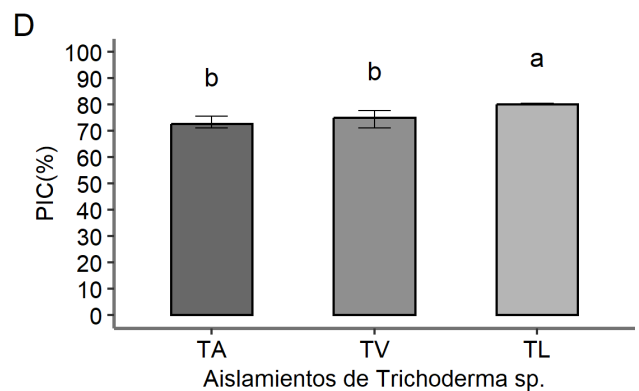
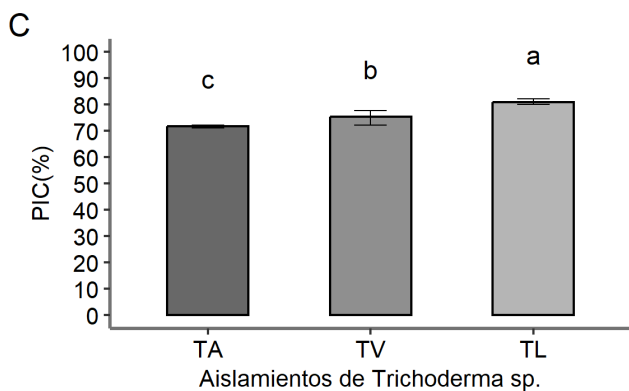
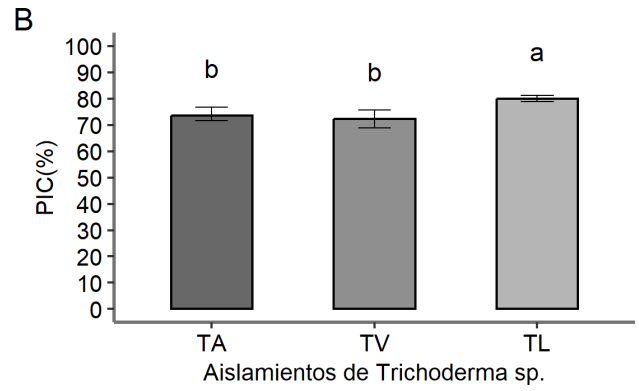
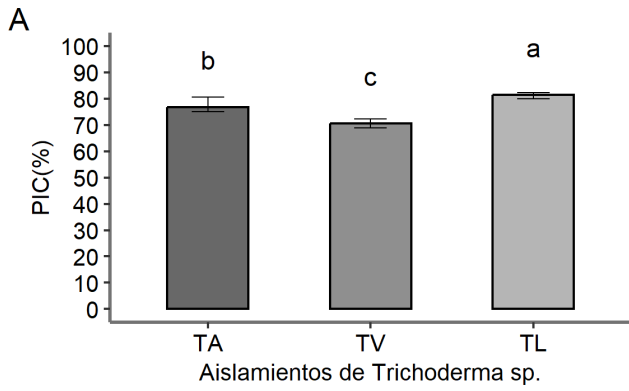
comparación al testigo. Los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) se encontraron entre 68,89 y 84,44%, además de presentar diferencias estadísticamente significativas entre las especies ($p < 0,05$) (Anexo 2).

El aislamiento de *T. longibrachiatum* demostró diferencias significativas en comparación a las demás especies para todas confrontaciones, obteniendo los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento. En específico, contra el aislado NEO-D5 (77,50%) y el más alto frente al aislamiento NEO-D1 (81,80%) (Figura 11).

Los resultados para las cepas de *T. asperellum* y *T. viride* variaron según el aislado del patógeno enfrentado y no existió diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre estos en las pruebas contra NEO-B1, NEO-C3, NEO-D1 y NEO-E5. La cepa de *T. asperellum* manifestó medias superiores y con diferencias significativas en contra de los aislamientos NEO-A1 (76,67%) y NEO-D5 (72,64%) en comparación a *T. viride*; sin embargo, caso contrario sucedió en los enfrentamientos con NEO-B6 (71,67%) y NEO-C5 (72,63%) donde obtuvo los PIC más bajos. En estos dos últimos casos, la especie *T. viride* sobresalió con PIC estadísticamente distintos de 75,41% y 75,69% respectivamente.

Figura 11

Gráficas de Porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC %) de T. asperellum (TA), T. viride (TV) y T. longibrachiatum (TL) sobre el patógeno NEO-A4 (A), NEO-B1 (B), NEO-B6 (C), NEO-C3 (D), NEO-C5 (E), NEO-D1 (F), NEO-D5 (G) y NEO-E5 (H)



En la actualidad, existen pocas investigaciones enfocadas al control, a pesar de esto existen algunos resultados como los obtenidos por Acosta (2022), el cual menciona haber encontrado PIC entre los 52,9% y 59,7% sobre diferentes aislados de no encontrar diferencias significativas entre las distintas cepas de *Trichoderma* evaluadas. Resultados similares fueron obtenidos por Achával y Meneguzzi (2022), dónde al evaluar cinco cepas contra el patógeno obtuvieron valores entre 40% a 60% de PIC. Con base a lo anterior, los valores obtenidos por *T. asperellum*, *T. viride* y *T. longibrachiatum* en la presente investigación, son superiores y por lo tanto, son prometedores como alternativas de control biológico para esta enfermedad en el cultivo de fresa.

Según Sánchez (2019) encontró PIC de entre 78,03% a 82,96% sobre el patógeno. De igual forma, Namen *et al.* (2023) reportó valores de un 89,7% y 86,8% de PIC sobre este mismo patógeno con dos cepas de *T. asperellum* y *Trichoderma* sp. De acuerdo con lo anterior, se evidencia que diferentes especies y cepas de *Trichoderma* spp. poseen la capacidad antagónica sobre el agente causal de la enfermedad de podredumbre de corona de fresa. No obstante, es necesario realizar a futuro otras evaluaciones como hiperparasitismo y la producción de compuestos volátiles para evaluar otros mecanismos de antagonismo de las especies de *Trichoderma* evaluadas en este estudio para clasificar el potencial de las cepas.

6. CONCLUSIONES

Con la metodología empleada se logró obtener diferentes aislados a partir de tejido vegetal afectado por la podredumbre de la corona de fresa en tres zonas productoras de Costa Rica.

La caracterización a partir de morfología y cultivos permitió clasificar a todos los aislados. Sin embargo, no se pudo determinar la especie asociada a dichos aislados utilizando solamente rasgos morfológicos.

Las pruebas *in vitro* señalan que las cepas de *T. asperellum*, *T. viride* y *T. longibrachiatum* utilizadas son antagonistas y se presentan como posibles estrategias de manejo de la enfermedad de la podredumbre de la corona de fresa.

7. RECOMENDACIONES

Para las plantaciones del cultivo de fresa a nivel nacional, es recomendable la toma de medidas que impidan la introducción y diseminación de la enfermedad de la podredumbre de la corona de fresa. Esto junto al uso de semilla certificada libre de fitopatógenos de corona y raíces. Con respecto a las pruebas de patogenicidad se recomienda realizar ensayos con otros métodos de inoculación de que se relacionen más con las condiciones de campo y prácticas de siembra del cultivo de fresa.

Es necesario realizar valoraciones de diagnóstico para otros segmentos de material vegetal de la planta de fresa (área foliar y frutos) que presentan sintomatologías asociadas a la podredumbre causadas por el patógeno.

En cuanto a las cepas de *T. asperellum*, *T. viride* y *T. longibrachiatum* es necesario llevar a cabo evaluaciones a nivel de campo, ya que los resultados obtenidos en esta investigación ubican a estos hongos antagonistas como posibles alternativas de manejo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, C. F. A., Álvarez, L. S. J., & Mora, E. D. C. (2020). Effect of the roof (Low tunnel) on the productivity of two varieties of strawberry (*Fragaria vesca*) in Cajanuma, Loja. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 31(1), 131-141. <http://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.10>
- Achával, F., y Meneguzzi, N. (2022). *Evaluación de cepas de Trichoderma: búsqueda de biocontroladores para el manejo sustentable de hongos patógenos de frutilla*. Conferencia de XVII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Argentina. https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/13378/INTA_CIAP_InstitutodePatolog%C3%ADaVegetal_Ach%C3%A1val_F_Evaluaci%C3%B3n_de_cepas.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Acosta, G. J. M. (2022). *Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de Trichoderma spp. y Clonostachys spp. frente a Neopestalotiopsis sp. en frutilla (Fragaria ananassa Duch.)*. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17413/1/13T01006.pdf>
- Acosta, G. U. (2022). Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. y efecto de fungicidas en pre y post-infección en el cultivo de fresa. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Chapingo]. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/ef236028-2016-4924-a261-d0006c1a2754/content>
- Aguilera, B. A. M. (2023). *Sensibilidad de aislados de Neopestalotiopsis spp. obtenidos de fresa a fungicidas de diferente modo de acción*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Chapingo]. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/75d73819-63a7-482c-bb26-b3dc49a24b70/content>
- Amuza, A. C., & Zaharia, R. (2022). *Trichoderma* spp.-mechanisms of action in the control of storage pathogens-review. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, 66(1). https://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2022/issue_1/Art113.pdf

- Ara, T., Monzur, S., Saand, M. A., Islam, R., Alam, S., & Hossain, M. (2017). The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. *International Journal of Biosciences*, 11(4), 350-358. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/11.4.350-358A>
- Aziz, B. A., & Marzani, Q. A. (2017). Molecular identification and management of *Rhizoctonia fragariae* the pathogen of black root rot of strawberry plant. *Science Journal of University of Zakho*, 5(2), 172-177. <http://sjuoz.uoz.edu.krd/index.php/sjuoz/article/view/485/365>
- Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89. [http://www.spentamexico.org/v1-n1/1\(1\)%2082-89.pdf](http://www.spentamexico.org/v1-n1/1(1)%2082-89.pdf)
- Baggio, J. S., & Peres, N. A. (2020). *Pestalotia* Leaf Spot and Fruit Rot of Strawberry: PP357, 9/2020. *EDIS*, 2020(5). <https://journals.flvc.org/edis/article/download/121908/125067>
- Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., & Peres, N. A. (2021). Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, 105(2), 305-315. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1290-RE>
- Baggio, J. S., Ruschel, R. G., Noling, J. W., & Peres, N. A. (2021). Physical, cultural, and chemical alternatives for integrated management of charcoal rot of strawberry. *Plant Disease*, 105(2), 295-304. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-20-0917-RE>
- Baggio, J., Wang, N.Y., Marin, M.V., Mertely, J.C., Peres, N.A. 2020. Understanding the biology and epidemiology of *Neopestalotiopsis* spp. (*Pestalotiopsis* spp.). *FSREF Research Reports*, 2019-2020. <https://member.floridastrawberry.org/wp-content/uploads/2020/08/FSREF-2019-20-Peres-Pestalotiopsis.pdf>

- Baker, K. F., & R. J. Cook. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, California. 433 pp. (Book, reprinted in 1982, Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul, Minnesota).
- Bárcenas-Santana, D., Guillén-Sánchez, D., Yazmín-Basaldua, C., Ramos-García, M. D. L., y Valle-de la Paz, M. (2019). Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(3), 454-463. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-5>
- Basavand, E., Pakdin-Parizi, A., Mirhosseini, H. A., & Dehghan-Niri, M. (2020). Occurrence of leaf spot disease on date palm caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 102, 959-959. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00530-5>
- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Bhagariya, D. A., & Prajapati, V. P. (2019). First report of *Pestalotiopsis clavispora* (GF Atk.) Steyaert causing crown rot disease on strawberry in India. *International Journal of Economic Plants*, 6(3), 140-142. <http://dx.doi.org/10.23910/IJEP/2019.6.3.0325>
- Bolda, M., Surendra, K., Fallon, J., Sánchez, M. y Peterson, K. (2015). *Manual de Producción de Fresa para los Agricultores de la Costa Central*. (2 Ed). <http://cesantabarbara.ucanr.edu/files/228580.pdf>
- Borrero, C., Castaño, R., & Avilés, M. (2018). First report of *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain. *Plant Disease*, 102(6), 1178-1178. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1529-PDN>
- Brunner-Mendoza, C., Navarro-Barranco, H., Ayala-Zermeño, M. A., Mellin-Rosas, M. A., y Toriello, C. (2013). Obtención y caracterización de cultivos monospóricos de

Metarhizium anisopliae (Hypocreales: Clavicipitaceae) para genotipificación. In XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Oaxaca, México (pp. 52-55). https://www.researchgate.net/publication/288669838_Obtencion_y_caracterizacion_de_cultivos_monosporicos_de_Metarhizium_anisopliae_Hypocreales_Clavicipitaceae_para_genotipificacion

Bucio Villalobos, C. M., Díaz Serrano, F. R., Martínez Jaime, O. A., y Torres Morales, J. J. (2016). Efecto del ozono sobre la población microbiana del suelo y el crecimiento de plantas de fresa. *Terra Latinoamericana*, 34(2), 229-237. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-57792016000200229&script=sci_arttext

Calvo-Araya, J. A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., y Orozco-Rodríguez, R. (2012). Aislamiento y evaluación *in vitro* de las antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía mesoamericana*, 23(2), 225-231. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v23n2/a01v23n2.pdf>

Cámara de Comercio de Bogotá [CCB]. (2015). *Manual Fresa*. <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14312/Fresa.pdf?sequence=1>

Castellanos, L., Baldovino, A., Céspedes, N., y Rivera, X. (2020). Biopreparados para el control de enfermedades foliares de fresa, Pamplona, Colombia, aun una solución parcial. *Journal of Negative and No Positive Results*, 5(9), 933-951. <https://dx.doi.org/10.19230/jonnpr.3419>

Castro Sánchez, J. P. (2017). *Determinación de las curvas de crecimiento y acumulación de nutrientes en la variedad Albion de fresa (Fragaria x ananassa) para establecer los requerimientos nutricionales de las plantaciones desarrolladas en la zona de Fraijanes, Cantón Central de Alajuela*. [Tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/74995>

- Centro Internacional de Biociencias Agrícolas [CABI]. (1 de marzo 2022). *Compendio de especies invasoras*. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24406#totaxonomicTree>
- Chamorro, R. D. M. (2014). *Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección de suelo en el control de hongos patógenos en el cultivo de la fresa, en las condiciones de cultivo de la provincia de Huelva*. [Tesis doctoral, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/79829/2014chamoevalu.pdf?sequence=1#page=96>
- Chamorro, M., Aguado, A., & De los Santos, B. (2016). First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Dis*, 100(7), 1495. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>
- Chordi, B. S. (2013). *Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad*. [Tesis de pregrado, Universidad de Lleida]. <https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/47159/schordib.pdf?jsessionid=E015538A607BD3B88373ED8309526A68?sequence=1>
- Chun, L. U. O., Yuyang, H. U., & Bo, S. H. U. (2021). Characterization of *Colletotrichum siamense* causing crown rot of strawberry in Jingzhou, Hubei Province. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(3), 12441-12441. <https://doi.org/10.15835/nbha49312441>
- Climatedata. (s.f). *Clima de Barva*. Clamate-Data.org. <https://es.climate-data.org/america-del-norte/costa-rica/heredia/barva-200534/>
- Comisión de Cambio Climático de Barva. (2019). *Plan de Acción por el Clima Cantón de Barva Año 2019*. Municipalidad de Barva. <https://munibarva.go.cr/wp-content/uploads/2021/04/%C2%B4plan-cantonal.pdf>

- Companiononi-González, B., Domínguez-Arizmendi, G., y García-Velasco, R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000400237
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. American Phytopathological Society. St. Paul.
- Correa, A., y Alarcon, L. (2015). *Cultivo de Frutilla. En una realidad sin bromuro de metilo en Chile*. https://www.unido.org/sites/default/files/files/2021-09/Cultivo_de_frutilla_Bromuro_de_metilo_en_Chile_UNIDO_ES_2015.pdf
- Darapanit, A., Boonyuen, N., Leesutthiphonchai, W., Nuankaew, S., & Piasai, O. (2021). Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases. *Scientific Reports*, 11(1), 22606. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02113-5>
- De Lucca-Agrelo, F. (2015). *Caracterización de la capacidad antagónica de cepas nativas de Trichoderma spp. frente a Bipolaris sorokiniana y Pyrenophora tritici-repentis*. [Tesis de pregrado, Universidad de la República]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8706/1/4063del.pdf>
- Dugan, F. M. (2006). *The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature*. <https://doi.org/10.1094/9780890545041>
- Elkhateeb, W. A., & Daba, G. M. (2021). The endophytic fungi *Pestalotiopsis* what's for it and what's on it. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology Research*, 4(1), 1-5. <https://doi.org/10.31579/2693-7247/032>
- Espino-Cerda, Á., Morales-García, J. L., Pedraza-Santos, M. E., y Morales-Montelongo, K. L. (04-07 de setiembre de 2017). *Pruebas de antagonismo con hongos asociados al síntoma de marchitez de árboles de aguacate en Michoacán, México*. Congreso Latinoamericano del Aguacate. Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_173.pdf

- Essa, T. A., Kamel, S. M., Ismail, A. M., & El-Ganainy, S. (2018). Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 46(1), 1-19. <http://dx.doi.org/10.21608/ejp.2018.87411>
- Fang, X., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., & Barbetti, M. J. (2011). Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Scientia Horticulturae*, 131, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.025>
- Gerardo-Lugo, S. S., Tovar-Pedraza, J. M., Maharachchikumbura, S. S. N., Apodaca-Sánchez, M. A., Correia, K. C., Saucedo-Acosta, C. P., Camacho-Tapia, M., Hyde, K. D., Marraiki, N., Elgorban, A. M., & Beltrán-Peña, H. (2020). Characterization of *Neopestalotiopsis* Species Associated with Mango Grey Leaf Spot Disease in Sinaloa, Mexico. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(10), 788. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100788>
- Gilbert, G. S., & Parker, I. M. (2023). Population ecology of plant disease. *The Evolutionary Ecology of Plant Disease*, 125. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198797876.003.0010>
- Gómez-Bolívar, T. M. (2017). *Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de Trichoderma spp. mediante fermentación en líquido y sólido*. [Tesis de pregrado, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/7079/evaluacion_diferentes_medios_condiciones_produccion.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Grados-Moreyra, N. J. (2024). *Antagonismo in vitro de Trichoderma spp. frente a Botrytis sp. y Fusarium sp., aislados de Fragaria ananassa "fresa". Ayacucho-2022*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. https://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/6338/1/TESIS%20B967_Gra.pdf

- Guaqueta-Huguet, S. D. D. P. (2019). *Efectos de los factores climáticos de producción sobre la extracción de nitrógeno, calcio y potasio en cultivos de fresa (Fragaria ananassa Duch cv Albión)*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76090/EFECTO%20DE%20LOS%20FACTORES%20CLIMATICOS%20DE%20PRODUCCION%20SOBRE%20LA%20EXTRACCI%20N%20DE%20NUTRIENTES%20EN%20FRESA.%20FINAL.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Hardigan, M. A., Lorant, A., Pincot, D. D., Feldmann, M. J., Famula, R. A., Acharya, C. B., ... & Knapp, S. J. (2021). Unraveling the complex hybrid ancestry and domestication history of cultivated strawberry. *Molecular biology and evolution*, 38(6), 2285-2305. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab024>
- Hemelrijck, W., Ceustermans, A., Van Campenhout, J., Lieten, P., & Bylemans, D. (Agosto de 2016). *Crown rot in strawberry caused by Pestalotiopsis*. En VIII International Strawberry Symposium 1156, Horst, Países Bajos. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.115>
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., y Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092007000100009
- Hidrobo-Chávez, J. A. (2020). *Evaluación morfológica y de patogenicidad del hongo Pestalotiopsis como agente causal de la pudrición de corona en frutillas (Fragaria x ananassa) variedad Albión*. [Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/9758/1/131917TSR.pdf>
- Hidrobo, J., Ramírez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Herrera, K., & León-Reyes, A. (2021). First Report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on

strawberry in Ecuador. *Plant Disease*, (ja). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1278-PDN>

Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., y Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451-458. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n3/v26n3a10.pdf>

Hsu, S. Y., Xu, Y. C., Lin, Y. C., Chuang, W. Y., Lin, S. R., Stadler, M., Tangthirasunun, N., Cheewangkoon, R., Al-Shwaiman, H. A., Elgorban, A. M., & Ariyawansa, H. A. (2024). Hidden diversity of *Pestalotiopsis* and *Neopestalotiopsis* (Amphisphaeriales, Sporocadaceae) species allied with the stromata of entomopathogenic fungi in Taiwan. *MycKeys*, 101, 275–312. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.101.113090>

Huang, L. (2018). *The Cholesterol Lowering Effects of Strawberry: A Randomized Controlled Trial Establishing Strawberry's Role in Cardiovascular Health*. [Thesis of master, Illinois Institute of Technology]. <https://www.proquest.com/pqdtglobal/docview/2070571710/2C609C13EF85462EPQ/10?accountid=37045>

Husaini, AM y Neri, D. (2016). *Fresa: crecimiento, desarrollo y enfermedades*. CABI. <https://books.google.co.cr/books?hl=es&lr=&id=iAauDQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&q=Strawberry+:+growth,+development&ots=PfzhGF78gK&sig=zbFJKt-qOzZgC1Z8Qep1TvqzR68>

Hytönen, T., Graham, J., & Harrison, R. (Eds.). (2018). *The genomes of Rosaceous berries and their wild relatives*. Springer. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-76020-9.pdf>

Ibadango-Ruiz, F. D. (2017). *Eficiencia y rentabilidad del sistema hidropónico vertical frente al convencional en la producción de tres variedades de fresa (Fragaria vesca L.), en la granja experimental Yuyucocha, Imbabura*. [Tesis de grado, Universidad Técnica del Norte].

<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/6405/1/03%20AGP%20211%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>

Ibanez, J. M., Lattar, T. E., & Obregon, V. G. (2023). *Neopestalotiopsis clavispora: patógeno asociado al cultivo de frutilla*. Asociación Argentina de Fitopatólogos. <https://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2023/04/Bolet%20C3%ADN-N%20B013-Neopestalotiopsis-frutilla-AAF-2023.pdf>

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, y Servicio Fitosanitario del Estado. (2017). *Manual de buenas prácticas agrícolas y de producción para el cultivo de la fresa*. <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2932/BVE17058869e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Instituto Meteorológico Nacional [IMN]. (2020). *Mapa interactivo de capas*. Instituto Meteorológico Nacional. <https://www.imn.ac.cr/web/imn/mapa>

Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC]. (2014). *CENAGRO: Cultivos Agrícolas. Total de fincas con cultivo de fresa por extensión sembrada y en edad de producción en hectáreas, según tamaño de la finca*. <https://www.inec.cr/sites/default/files/documetos-biblioteca-virtual/recenagro2014-t2-113.xlsx>

Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria [INTA]. (2017). *Guía para la toma de muestras vegetales en el diagnóstico de enfermedades fungo-bacterianas*. Boletín Técnico 2. http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/05/L8_Guia_para_la_toma_de_muestras_vegetales_en_el_diagnostico_de_enfermedades_Fungo-bacterianas-min.pdf

Iqbal, M., Jamshaid, M., Zahid, M. A., Andreasson, E., Vetukuri, R. R., & Stenberg, J. A. (2021). Biological control of strawberry crown rot, root rot and grey mould by the beneficial fungus *Aureobasidium pullulans*. *BioControl*, 66(4), 535-545. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10083-w>

- Ismail, A. M., Cirvilleri, G., & Polizzi, G. (2013). Characterisation and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* and *Pestalotiopsis clavispora* causing grey leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.) in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 135, 619-625. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0117-z>
- Jiménez-Madrid, A. M., Muñoz, G., Collins, C., & Brannen, P. (2024). First report of the new *Neopestalotiopsis* species causing strawberry leaf spot and fruit rot in Georgia. *Plant Disease*, (ja). <https://doi.org/10.1094/pdis-02-24-0409-pdn>
- Lazarotto, M., Bovolini, M. P., Muniz, M. F. B., Harakawa, R., Reiniger, L. R. S., & Santos, Á. F. D. (2014). Identification and characterization of pathogenic *Pestalotiopsis* species to pecan tree in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49, 440-448. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000600005>
- López-Jarrín, M. C. (2021). *Diagnóstico morfológico de la pudrición de la corona de la fresa (Fragaria x ananassa Duchesne ex Rozier) en el cantón Quito*. [Tesis de postgrado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/23969/1/UCE-FAG-LOPEZ%20MAYRA.pdf>
- Machín-Barreiro, J. A. (2017). *Identificación de los organismos asociados a la muerte de plantas de frutilla (Fragaria ananassa Duch.) en el departamento de Salto, Uruguay*. [Tesis pregrado, Universidad de la República]. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/18658/1/TTS_Mach%C3%ADnBarreiroJorgeAlex.pdf
- Machín, A., González, P., Vicente, E., Sánchez, M., Estelda, C., Ghelfi, J., & Silvera-Pérez, E. (2019). First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on strawberry in Uruguay. *Plant Disease*, 103(11), 2946-2946. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN>

- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L. D., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W. P., Sun, X., ... & Hyde, K. D. (2012). A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, 56, 95-129. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0198-1>
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121-186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Marín, M. V., Seijo, T., Oliveira, M. S., Zuchelli, E., Mertely, J., & Peres, N. A. (2018). First report of *Phytophthora nicotianae* causing crown rot of strawberry in the United States. *Plant Disease*, 102(7), 1463-1463. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1333-PDN>
- 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 × ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, 51(6), 673-681. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952017000600673&script=sci_arttext
- Martino, I., Monchiero, M., Gullino, M. L., & Guarnaccia, V. (2024). Characterization and pathogenicity of fungal species associated with hazelnut trunk diseases in North-western Italy. *Journal of Plant Pathology*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s42161-024-01595-2>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG]. (2007). *Agrocadena de la fresa*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9555.pdf>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG]. (2017). *PITTA - Fresa. Plan Estratégico: Análisis de Contexto*. <http://www.snitta.org/web/pittas.php?p=32&s=PLAN ESTRATEGICO>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2019). *Guía de gestión integrada de plagas de fresa y fresón*. https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/guiagipfresayfreson_tcm30-507859.pdf

- Morales, C. G., Riquelme, J., Pedreros, A., Uribe, H., Hirzel, J., France, A., y Abarca, P. (2017). *Manual de manejo agronómico de la frutilla*. Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6713/NR40987.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., y Contreras-Paredes, C. A. (2020). Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 434-449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Morales-Mora, L. A., Martínez-Salgado, S. J., Valencia de Ita, M. A., Andrade-Hoyos, P., Silva-Rojas, H. V., & Romero-Arenas, O. (2019). First report of leaf spot and anthracnosis caused by *Pestalotiopsis* sp. on strawberry in Puebla, Mexico. *Plant Dis*, 103(2668), 10-1094. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1010-PDN>
- Muñoz, V., Cisterna, V., & France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos*. Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67165/NR42411.pdf>
- Namen, S., Heredia A.M, Kirshbaum D. y Ramallo A. (2023). *Control biológico de Neopestalotiopsis clavispora, agente causal de la podredumbre de raíces y corona de la frutilla*. Conferencia del XL Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, Tucumán, Argentina.
https://www.researchgate.net/publication/375028020_Control_biologico_de_Neopestalotiopsis_clavispora_agente_causal_de_la_podredumbre_de_raices_y_corona_de_la_frutilla_Biological_control_of_Neopestalotiopsis_clavispora_causal_agent_of_strawberry_root_a
- Namesny, A.; Conesa, C.; Olmos, L. M. y Papasseit, P. (2022). *Cultivo, postcosecha, procesado y comercio de berries*. Especialistes en Serveis per a la producció

(SPE).https://issuu.com/horticulturaposcosecha/docs/cultivo_poscosecha_procesado_y_comercio_de_berries

Noh, Y. H., Oh, Y., Mangandi, J., Verma, S., Zurn, J. D., Lu, Y. T., ... & Lee, S. (2018). High-throughput marker assays for FaR_{Pc}2-mediated resistance to *Phytophthora* crown rot in octoploid strawberry. *Molecular Breeding*, 38(8), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0861-7>

Obregón, VG, Meneguzzi, NG, Ibañez, JM, Lattar, TE y Kirschbaum, DS. (2018). Primer reporte de *Neopestalotiopsis clavispora* como causante de pudrición de raíz y corona en plantas de fresa en Argentina. *Plant Disease*, 102(9), 1856. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación [FAO]. (2022). *Cultivos y productos de ganadería*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>

Park, K., Han, I., Lee, S. M., Choi, S. L., Kim, M. C., & Lee, H. (2019). Crown and root rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 47(4), 427-435. <https://doi.org/10.4489/KJM.20190047>

Pastrana-León, A. M. (2014). Incidencia y epidemiología de nuevos hongos patógenos de fresa en la provincia de Huelva. Desarrollo de herramientas biotecnológicas y aplicación de otras estrategias de control. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/68567/2014pastrincid.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pastrana, A. M., Basallote-Ureba, M. J., Aguado, A., Akdi, K., & Capote, N. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia mediterranea*, 109-120. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-16363

- Patiño, D., García, E., Barrera, E., Quejada, O., Rodríguez, H. y Arroyave, I. (2015). *Manual técnico del cultivo de fresa bajo buenas prácticas agrícolas*. Francisco Vélez. https://issuu.com/linaknup/docs/manual_fresa-_final__caratula_baja
- Peres, N. A., & Baggio, J. S. (2019). Phytophthora Crown Rot of Strawberry: PP350, 10/2019. *EDIS*, 2019(5), 3-3. doi.org/10.32473/edis-pp350-2019
- Poveda-Coronel, C. A., Riaño Jiménez, D., Aguilar Benavides, L. y Cure, J. R. (2018). Eficiencia de polinización de colonias huérfanas de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) en fresa (*Fragaria x ananassa*) bajo cubierta. *Acta Biológica Colombiana*, 23(1), 73-79. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v23n1.61648>
- Prabha, S., Gogoi, A., Mazumder, P., Ramanathan, A. L., & Kumar, M. (2017). Assessment of the impact of textile effluents on microbial diversity in Tirupur district, Tamil Nadu. *Applied water science*, 7, 2267-2277. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0394-3>
- Prieto-Gómez, M. L. (2019). *Determinación de la patogenicidad de cepas nativas de Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, e Isaria fumosorosea sobre “Chanchito blanco de la vid”, Pseudococcus viburni (Hemiptera: Pseudococcidae)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/8720/Biprgoml1.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Rajashekara, H., Pandian, R. T. P., Mahadevakumar, S., Raviprasad, T. N., Vanitha, K., Siddanna, S., ... & Chandranayaka, S. (2023). First report of *Neopestalotiopsis clavisporea* causing cashew leaf blight disease in India. *Plant Disease*, 107(9), 2864. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0545-PDN>
- Ramírez-Valadez, M. G. (2017). *Identificación y control biológico del complejo de hongos causantes de la secadera de la fresa en Jacona, Michoacan*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma Chapingo]. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/261ce7c2-de0f-4fa4-b742-0b392d0321a5/content>

- Ramírez, H. G., Ramírez, W. S., Cantoral, M. T., y Torres, E. (2013). *Manual de producción y uso de hongos antagonistas*.
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., & Parra-Robles, B. E. (2020). An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease*, *104*(8), 2054-2059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>
- Rivera-Coto, G. (2018). *Conceptos introductorios a la fitopatología*. Universidad Estatal a Distancia (UNED).
- Rivera, Y. C. (2017). *Micropropagación de la fresa (Fragaria X ananassa Duchesne ex Rozier)*. [Tesis doctoral, Universidad de Matanzas].
[http://cict.umcc.cu/repositorio/tesis/Trabajos%20de%20Diploma/Agronom%C3%ADa/2017/Micropropagaci%C3%B3n%20de%20fresa%20\(Fragaria%20X%20ananassa%20Duchesne%20ex%20Rozier\)%20\(Yuneiry%20Chirino%20Rivera\).pdf](http://cict.umcc.cu/repositorio/tesis/Trabajos%20de%20Diploma/Agronom%C3%ADa/2017/Micropropagaci%C3%B3n%20de%20fresa%20(Fragaria%20X%20ananassa%20Duchesne%20ex%20Rozier)%20(Yuneiry%20Chirino%20Rivera).pdf)
- Romero-Ugaz, V. G. (2018). *Eficiencia de Trichoderma viride como un biocontrolador para Phytophthora capsici en el cultivo de pimiento (Capsicum annuum L.)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina].
<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3554/romero-ugaz-virginia-graciela.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rueda, D. (2015). *Botánica Sistemática*. ESPE Universidad de las Fuerzas Armadas.
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10180/1/Bot%C3%A1nica%20sist%C3%A9mica.pdf>
- Salazar, R., y David, J. (2017). *Elaboración de curvas de crecimiento y absorción de nutrimentos del cultivo de fresa (Fragaria ananassa cv. Festival) en Fraijanes, Costa*

- Rica. [Tesis de grado, Universidad de Costa Rica].
<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/4902/1/42286.pdf>
- Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J., y Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3). <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/973>
- Sánchez-Selgas, M. N. (2019). *Caracterización y selección de cepas de Trichoderma spp. antagonistas de Dactylonectria macrodidyma, Macrophomina phaseolina, Neopestalotiopsis clavispora y Rhizoctonia sp.* [Tesis de grado, Universidad de la República de Uruguay].
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/29725/1/S%c3%a1nchezSelgasMateoNicol%c3%a1s.pdf>
- Sánchez, H. Y. (2015). *Caracterización morfológica y productiva de selecciones avanzadas de fresa (Fragaria x ananassa Duch.)*. [Tesis maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].
http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2056
- Sánchez, S., Henríquez, J. L., Urcola, L. A., Scott, A., & Gambardella, M. (2016). Susceptibility of strawberry cultivars to root and crown rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Berry Research*, 6(3), 345-354. DOI:10.3233/JBR-150114
- Santos, C. C., Domingues, J. L., Santos, R. F. D., Spósito, M. B., Santos, A., & Novaes, Q. S. (2019). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on macadamia in Brazil. *Plant disease*, 103(7), 1790-1790. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0108-PDN>
- Sarazú-Flores, E. F. (2018). *Acopio y comercialización de fresas*. [Tesis de maestría, Universidad Tecnológica de Perú].
https://repositorio.utp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12867/2250/Edward%20Sarazu_Trabajo%20de%20Investigacion_Maestria_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria [SEPSA]. (2017). *Boletín Estadística Agropecuario N°28* . Serie Cronológica 2014 - 2017. <http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA29.xls>
- Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria [SEPSA]. (2018). *Boletín Estadística Agropecuario N°29* . Serie Cronológica 2015 - 2018. <http://www.sepsa.go.cr/DOCS/BEA/BEA28/index.html>
- Shahriar, S. A., Nur-Shakirah, A. O., & Mohd, M. H. (2022). *Neopestalotiopsis clavispora* and *Pseudopestalotiopsis camelliae-sinensis* causing grey blight disease of tea (*Camellia sinensis*) in Malaysia. *European Journal of Plant Pathology*, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02433-2>
- Shi, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Xue, C., ... & Wang, F. (2021). First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Calyx and Receptacle Blight on Strawberry in China. *Plant Disease*, (ja). <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-21-1376-PDN>
- Shi, X., Hernández, R., & Hoffmann, M. (2021). Timing of stolon removal alters daughter plant production and quality in the ever-bearing strawberry ‘Albion’. *HortScience*, 56(6), 650-656. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15624-20>
- Sigillo, L., Ruocco, M., Gualtieri, L., Pane, C., & Zaccardelli, M. (2020). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 102(1), 281-281. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00415-2>
- Singleton, L. L., Mihail, J. D., & Rush, C. M. (1992). *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. <https://my.apsnet.org/APSSStore/Product-Detail.aspx?WebsiteKey=2661527A-8D44-496C-A730-8CFEB6239BE7&iProductCode=41272>
- Skidmore, A. M., & Dickinson, C. H. (1976). Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80092-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80092-7)

- Solarte-Quintero, A. F. (2014). *Caracterización morfológica, molecular y patogénica de Pestalotiopsis sp. Agente causante de la enfermedad del clavo en la guayaba (Psidium guajava) y evaluación in-vitro de biofungicidas*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia].
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21921/7711508.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Solarte, F., Muñoz, C. G., Maharachchikumbura, S. S., & Álvarez, E. (2018). Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., causal agents of guava scab in Colombia. *Plant disease*, 102(1), 49-59. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0068-RE>
- Solpot, T. C., Villanueva, J. D., Abello, M. P., & Zúñiga, J. B. M. (2024). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing foliar disease of rubber (*Hevea brasiliensis*) in the Philippines. *Journal of Phytopathology*, 172(1), e13238.
<https://doi.org/10.1111/jph.13238>
- Strand, L. L. (2008). *Integrated pest management for strawberries*. (Vol. 3351). University of California Agriculture and Natural Resources Publications.
- Vallejo-Garcés, A. V. (2021). Evaluación de la patogenicidad y agresividad de aislados de *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp. asociados a la pudrición de corona de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.), en invernadero. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
<http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/15658/1/13T00942.pdf>
- Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., ... y Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149.
<https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200128>

- Watanabe, T. (2018). Pictorial atlas of soilborne fungal plant pathogens and diseases (1st ed.). CRC Press.
- Widyaningsih, S., & Triasih, U. (13-14 April 2021). *Biological Control of Strawberry Crown Rot Disease (Pestalotiopsis sp.) using Trichoderma harzianum and Endophytic Bacteria*. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 3rd International Conference on Sustainable Agriculture, Yogyakarta, Indonesia. <https://doi.org/10.1088/1755-1315%2F752%2F1%2F012052>
- Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., & Chung, P. C. (2021). First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease*, 105(2), 487-487. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1045-PDN>
- Ye, C., Jing, T., Sha, Y., Mo, M., & Yu, Z. (2023). Two new *Trichoderma* species (Hypocreales, Hypocreaceae) isolated from decaying tubers of *Gastrodia* elate. *MycKeys*, 99, 187. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.99.109404>
- Zhang, L., Song, L., Xu, X., Zou, X., Duan, K., & Gao, Q. (2020). Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in eastern China. *Plant Disease*, 104(7), 1960-1968. <https://doi.org/10.1094/pdis-10-19-2241-re>
- Zhu, R. J., Liu, Y. L., Li, H. Y., Liu, J. B., & Han, X. Y. (2023). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf spots on *Garcinia mangostana* in China. *Plant Disease*, 107(6), 1946. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1120-PDN>

9. ANEXOS

Anexo 1

Preparación de medios de cultivo

Medio PDA

Para la preparación del medio de cultivo PDA se usará el producto comercial Oxoid CM139 el cual está formulado con papa (4 g/L), dextrosa (20 g/L) y agar (15 g/L), se utilizarán 39 g mezclado con 500 ml de agua destilada calentando por unos minutos agregando hasta aforar

a un litro. Seguidamente se coloca en recipientes con tapa para llevar a la autoclave durante 15 minutos.

Anexo 2

Análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey de los porcentajes de inhibición (PIC) de las especies de T. asperellum, T. viride y T. longibrachiatum según enfrentamiento. (alfa=0,05)

NEO-A4

```

          Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
G          2  236.01   118.0    34.76 5.85e-05 ***
Residuals  9   30.56     3.4

```

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

\$parameters

```

test name.t ntr StudentizedRange alpha
Tukey      G   3           3.948492  0.05

```

\$means

```

      PIC      std r      se      Min      Max      Q25      Q50      Q75
TA 76.66667 2.644973 4 0.9212847 75.00000 80.55556 75.00000 75.55556 77.22222
TL 81.38889 1.063808 4 0.9212847 80.00000 82.22222 80.83333 81.66667 82.22222
TV 70.55556 1.434438 4 0.9212847 68.88889 72.22222 69.72222 70.55556 71.38889

```

\$comparison

NULL

\$groups

```

      PIC groups
TL 81.38889    a
TA 76.66667    b
TV 70.55556    c

```

NEO-B1

```

          Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
G          2  139.56   69.78   15.8 0.00114 **
Residuals  9   39.74    4.42

```

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

```

$parameters
  test name.t ntr StudentizedRange alpha
  Tukey      G   3           3.948492  0.05

```

```

$means
      PIC      std r      se      Min      Max      Q25      Q50      Q75
TA 73.47222 2.2395160 4 1.05063 71.66667 76.66667 72.08333 72.77778 74.16667
TL 80.00000 0.9072184 4 1.05063 78.88889 81.11111 79.72222 80.00000 80.27778
TV 72.22222 2.7216553 4 1.05063 68.88889 75.55556 71.38889 72.22222 73.05556

```

```

$comparison
NULL

```

```

$groups
      PIC groups
TL 80.00000      a
TA 73.47222      b
TV 72.22222      b

```

NEO-B6

```

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
G      2 169.91   84.95   36.56 4.77e-05 ***
Residuals 9  20.91    2.32
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

```

$parameters
  test name.t ntr StudentizedRange alpha
  Tukey      G   3           3.948492  0.05

```

```

$means
      PIC      std r      se      Min      Max      Q25      Q50      Q75
TA 71.66667 0.6415003 4 0.7621332 71.11111 72.22222 71.11111 71.66667 72.22222
TL 80.83333 1.0638079 4 0.7621332 80.00000 82.22222 80.00000 80.55556 81.38889
TV 75.41667 2.3295825 4 0.7621332 72.22222 77.77778 74.72222 75.83333 76.52778

```

```

$comparison
NULL

```

```

$groups
      PIC groups
TL 80.83333      a
TV 75.41667      b
TA 71.66667      c

```

NEO-C3

```

      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
G      2 122.38   61.19   14.56 0.00151 **
Residuals 9  37.81    4.20
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

\$parameters

test name	t	ntr	StudentizedRange	alpha
Tukey	G	3	3.948492	0.05

\$means

	PIC	std r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75	
TA	72.50000	2.1032994	4	1.024812	71.11111	75.55556	71.11111	71.66667	73.05556
TL	80.13889	0.2777778	4	1.024812	80.00000	80.55556	80.00000	80.00000	80.13889
TV	74.86111	2.8463752	4	1.024812	71.11111	77.77778	73.61111	75.27778	76.52778

\$comparison

NULL

\$groups

	PIC	groups
TL	80.13889	a
TV	74.86111	b
TA	72.50000	b

NEO-C5

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
G	2	127.52	63.76	42.74	2.54e-05 ***
Residuals	9	13.43	1.49		

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

\$parameters

test name	t	ntr	StudentizedRange	alpha
Tukey	G	3	3.948492	0.05

\$means

	PIC	std r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75	
TA	72.63889	1.3888889	4	0.6106901	71.11111	74.44444	71.94444	72.50000	73.19444
TL	80.55556	1.4344383	4	0.6106901	78.88889	82.22222	79.72222	80.55556	81.38889
TV	75.69444	0.6990587	4	0.6106901	75.00000	76.66667	75.41667	75.55556	75.83333

\$comparison

NULL

\$groups

	PIC	groups
TL	80.55556	a
TV	75.69444	b
TA	72.63889	c

NEO-D1

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
G	2	223.20	111.60	34.71	5.88e-05 ***
Residuals	9	28.94	3.22		

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

\$parameters

test	name.t	ntr	StudentizedRange	alpha
Tukey	G	3	3.948492	0.05

\$means

	PIC	std r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
TA	74.16667	1.6666667	4 0.8965239	72.22222	75.55556	73.05556	74.44444	75.55556
TL	81.80556	2.5408190	4 0.8965239	78.88889	84.44444	80.13889	81.94444	83.61111
TV	71.66667	0.6415003	4 0.8965239	71.11111	72.22222	71.11111	71.66667	72.22222

\$comparison

NULL

\$groups

	PIC	groups
TL	81.80556	a
TA	74.16667	b
TV	71.66667	b

NEO-D5

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
G	2	131.64	65.82	74.53	2.51e-06 ***
Residuals	9	7.95	0.88		

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

\$parameters

test	name.t	ntr	StudentizedRange	alpha
Tukey	G	3	3.948492	0.05

\$means

	PIC	std r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
TA	72.63889	0.5319039	4 0.4698561	72.22222	73.33333	72.22222	72.50000	72.91667
TL	77.50000	1.3981175	4 0.4698561	75.55556	78.88889	77.22222	77.77778	78.05556
TV	69.44444	0.6415003	4 0.4698561	68.88889	70.00000	68.88889	69.44444	70.00000

\$comparison

NULL

\$groups

	PIC	groups
TL	77.50000	a
TA	72.63889	b
TV	69.44444	c

NEO-E5

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
G	2	216.26	108.13	36.66	4.72e-05 ***
Residuals	9	26.54	2.95		

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

\$parameters

test name	t	nt	StudentizedRange	alpha
Tukey	G	3	3.948492	0.05

\$means

	PIC	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
TA	73.05556	0.555556	4	0.8586684	72.22222	73.33333	73.05556	73.33333	73.33333
TL	81.11111	2.4002743	4	0.8586684	77.77778	83.33333	80.27778	81.66667	82.50000
TV	71.38889	1.6666667	4	0.8586684	68.88889	72.22222	71.38889	72.22222	72.22222

\$comparison

NULL

\$groups

	PIC	groups
TL	81.11111	a
TA	73.05556	b
TV	71.38889	b