

Evaluación preliminar de la eficacia de tres fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schlttdl. asociado a plantas enfermas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.).

Jessica María Hidalgo Garro

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA
AGRÓNOMA CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA.

ESCUELA DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

2019

Evaluación preliminar de la eficacia de tres fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schlttdl. asociado a plantas enfermas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.).

Jessica María Hidalgo Garro

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE PROFESIONAL DE INGENIERA
AGRÓNOMA CON EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA.



DIRECTOR DE TESIS

Oscar Castro Zúñiga M.Sc.



MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Gerardina Umaña Rojas Ph. D.



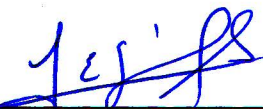
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Amy Wang Wong M.Sc.



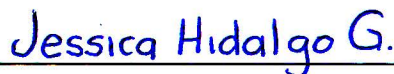
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Catalina Ruiz Campos Lic.



DIRECTOR DE ESCUELA

Luis Gómez Alpizar Ph. D.



SUSTENTANTE

Jessica María Hidalgo Garro

2019

DEDICATORIA

A mi papá Rolando Hidalgo y a mi mamá Laura Garro, por estar ahí en las buenas y malas con su apoyo y amor incondicional en cada momento de mi vida y motivarme a concluir esta etapa. A mi hermano Steven Hidalgo por el apoyo.

A toda mi familia y mis amigos por sus buenos consejos y apoyo durante toda la carrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por el apoyo incondicional.

A mi director de Tesis Oscar Castro y a Gabriela Chinchilla, por su gran ayuda, paciencia y disponibilidad durante todo el proceso. A los profesores del Laboratorio de Tecnología Poscosecha, por la ayuda y los buenos consejos. También a mi comité de tesis por todo el apoyo y el tiempo invertido en todo este periodo.

A mis amigos que siempre estuvieron ahí apoyándome en cada momento, que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo de esta investigación, en especial a Joan Mora que ha estado en cada momento apoyándome incondicionalmente, por su paciencia y sus consejos para ser una mejor persona. A Estefanía Ortiz (Nia) por la compañía en estos últimos años, escuchándome y dándome consejos. También a Nathalie Castro y Bryan Viquez por su apoyo y amistad durante todos estos años de universidad.

A mis amigos Donny y Roberto (Tillo), que siempre han estado brindándome su ayuda, y con los cuales siempre he podido confiar y contar con ellos en las buenas y en las malas.

Y a cada uno que de una u otra manera han contribuido en la finalización de esta etapa importante de mi vida.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. Introducción.....	2
2. Revisión de literatura	4
2.1. Generalidades del cultivo de piña	4
2.2. Requerimientos agroecológicos del cultivo de piña	5
2.3. Plagas y enfermedades del cultivo de la piña	6
2.4. Generalidades de <i>Fusarium</i> spp	7
2.5. <i>Fusarium</i> sp. en piña.....	9
2.6. Fungicidas usados para el combate de <i>Fusarium</i> spp.....	9
2.7. Evaluación de la eficacia de los fungicidas a nivel <i>in vitro</i>	12
3. Objetivo general.....	13
4. Objetivos específicos.....	13
5. Metodología:.....	14
5.1. Sitio experimental	14
5.2. Material experimental.....	14
5.3. Tratamientos evaluados	15
5.4. Propagación del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	16
5.5. Métodos de evaluación de eficacia	17
5.5.1. Crecimiento radial	17
5.5.2. Germinación de esporas y longitud del tubo germinativo.....	18
5.6. Diseño experimental.....	21
6. Resultados	22
6.1. Crecimiento de diámetro de colonia	22
6.2. Germinación de esporas y longitud del tubo germinativo.....	25
7. Discusión.....	31
8. Conclusiones.....	38
9. Recomendaciones.....	39

10. Bibliografía	40
11. Anexos	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características microscópicas de <i>Fusarium oxysporum</i> . Fuente: Monzón y Rodríguez 1997.	8
Figura 2. Clasificación de la germinación de esporas de <i>F. oxysporum</i> expuestas a diferentes concentraciones del fungicida carbendazim. San Pedro, Costa Rica, 2019.	19
Figura 3. Programa IMAGEJ 1.52a utilizado para la medición de la longitud del tubo germinativo de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> , aislado de plantas enfermas de piña, expuestas a los fungicidas propiconazole y epoxiconazole. San Pedro, Costa Rica, 2019.	20
Figura 4. Inhibición de crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> "in vitro" en medio de cultivo enmendado con el fungicida carbendazim; San Pedro, Costa Rica, 2019... ..	22
Figura 5. Porcentaje de reducción de crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> "in vitro" en medio de cultivo enmendado con el fungicida epoxiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.	23
Figura 6. Porcentaje de reducción de crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> "in vitro" en medio de cultivo enmendado con el fungicida propiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.	25
Figura 7. Porcentaje de conidios de <i>F. oxysporum</i> , por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) de los cinco aislamientos, al exponerlos a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.	28
Figura 8. Porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de <i>F. oxysporum</i> expuestos a diferentes concentraciones del fungicida epoxiconazole a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.	29
Figura 9. Porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de <i>F. oxysporum</i> expuestos a diferentes concentraciones del fungicida propiconazole a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los aislamientos evaluados según el tejido a partir del cual se realizó el aislamiento y la región de donde se recolectaron. San Pedro, Costa Rica, 2019.	15
Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la prueba de eficacia de fungicidas contra el hongo <i>Fusarium oxysporum</i> aislado de plantas de piña enfermas. San Pedro, Costa Rica, 2019.	16

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Inhibición de crecimiento micelial de los cinco aislamientos de <i>F. oxysporum</i> "in vitro", en medio de cultivo enmendado a diferentes concentraciones con el fungicida carbendazim; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	49
Anexo 2. Inhibición de crecimiento micelial de los cinco aislamientos de <i>F. oxysporum</i> "in vitro", en medio de cultivo enmendado a diferentes concentraciones con el fungicida epoxiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.	50
Anexo 3. Inhibición de crecimiento micelial de los cinco aislamientos de <i>F. oxysporum</i> "in vitro", en medio de cultivo enmendado a diferentes concentraciones con el fungicida propiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	51
Anexo 4. Análisis estadístico del porcentaje de reducción del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> "in vitro" en medio de cultivo enmendado con el fungicida epoxiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.	52
Anexo 5. Análisis estadístico del porcentaje de reducción del crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> "in vitro" en medio de cultivo enmendado con el fungicida propiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	53
Anexo 6. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de <i>F. oxysporum</i> , por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento uno, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	54
Anexo 7. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de <i>F. oxysporum</i> , por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento dos, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	55
Anexo 8. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de <i>F. oxysporum</i> , por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento tres, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	56
Anexo 9. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de <i>F. oxysporum</i> , por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del	

aislamiento cuatro, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel " <i>in vitro</i> "; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	57
Anexo 10. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de <i>F. oxysporum</i> , por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento cinco, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel " <i>in vitro</i> "; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	58
Anexo 11. Análisis estadístico del porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de <i>F. oxysporum</i> expuestos a diferentes concentraciones del fungicida epoxiconazole a nivel " <i>in vitro</i> "; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	59
Anexo 12. Análisis estadístico del porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de <i>F. oxysporum</i> expuestos a diferentes concentraciones del fungicida propiconazole a nivel " <i>in vitro</i> "; San Pedro, Costa Rica, 2019.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CIA	Centro de Investigaciones Agronómicas
CIPROC	Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos
DC	Dosis comercial
DC/10	Dosis comercial a la décima parte
DC/100	Dosis comercial a la centésima parte
DGC	Di Rienzo, Guzmán y Casanoves
DMI	Inhibidores de la Desmetilación-C14 (por sus siglas en inglés)
MBC	Carbamatos de metilbenzimidazol (por sus siglas en inglés)
PDA	Agar papa dextrosa (por sus siglas en inglés)
PDA+	Agar papa dextrosa con ácido
PIC	Porcentaje de inhibición del crecimiento
PILT	Porcentaje de inhibición de longitud del tubo germinativo
PPM	Partes por millón
SFE	Servicio Fitosanitario del Estado

RESUMEN

La producción de piña se enfrenta a problemas fitosanitarios, como enfermedades causadas por hongos de suelo, dentro de los cuales se encuentra el hongo *Fusarium oxysporum*. Esto ha ocasionado el uso desmedido de diversos fungicidas para su combate, ocasionado problemas ambientales. Debido a esto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar preliminarmente la eficacia a nivel *in vitro* de tres fungicidas sobre *F. oxysporum* asociado a plantas enfermas de piña con el fin utilizar esta información en estudios futuros. Se utilizaron cinco aislamientos del patógeno y tres fungicidas: carbendazim, epoxiconazole y propiconazole, en tres concentraciones: la dosis comercial (DC), la décima parte (DC/10) y la centésima parte (DC/100) de la misma. Se evaluó el porcentaje de reducción de diámetro de colonia (PIC) para cada fungicida, el porcentaje de germinación de esporas (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinado) para el fungicida carbendazim y el porcentaje de reducción de la longitud de tubo germinativo para los fungicidas epoxiconazole y el propiconazole. Los datos se analizaron mediante un arreglo factorial y las diferencias entre medias de tratamientos, con la prueba DGC, con un rango de confianza del 95%. Para el crecimiento micelial, los cinco aislamientos fueron susceptibles al fungicida carbendazim, inhibiendo el 100% de crecimiento a las tres concentraciones evaluadas. En el epoxiconazole y propiconazole se observó que a menor concentración de los fungicidas se presenta un menor PIC, obteniendo para las tres concentraciones porcentajes entre 60% y 100% de inhibición para los cinco aislamientos. En cuanto al porcentaje de germinación hubo diferencias entre las concentraciones y entre los aislamientos evaluados, en donde los aislamientos uno y dos mostraron ser más susceptibles, aislamiento cuatro y cinco tuvieron una susceptibilidad media y el aislamiento tres la menor susceptibilidad. Para la reducción de la longitud del tubo germinativo, tanto el fungicida epoxiconazole como el propiconazole, no presentaron diferencias significativas entre concentraciones ni aislamientos, solamente el propiconazole a la concentración de dosis comercial en el aislamiento cuatro presentó diferencia con un porcentaje de reducción en la longitud de tubo germinativo de 11.3%.

Evaluación preliminar de la eficacia de tres fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schlttdl. asociado a plantas enfermas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.)

1. Introducción

La piña (*Ananas comosus* L.) pertenece a la familia de las bromeliáceas, al género *Ananas*, originaria de América del Sur y es una de las frutas tropicales más importantes en el mercado mundial, después del banano y los cítricos (Pinzón *et al.* 2011). Esta actividad agrícola se desarrolla en varios países, siendo su producción mundial de 29 millones de toneladas para el 2017. Los principales productores de piña fresca son (en millones de toneladas anuales): Costa Rica (3,0), Filipinas (2,7), Brasil (2,3), Tailandia (2,1) e India (1,9) (FAO 2019).

Según Fresh Plaza (2018), en el año 2016 Costa Rica exportó 3,2 millones de toneladas, el 12% del volumen total mundial, siendo el mayor exportador. En el país la producción de piña se concentra principalmente en tres regiones, un 56% se localiza en la Región Huetar Norte, 25% en la Huetar Atlántica y 19% en la Región Pacífico (CANAPEP 2018).

En los últimos años el área cultivada en Costa Rica se ha incrementado, abarcando en la actualidad cerca de 44.500 ha de cultivo, sembradas principalmente con la variedad MD-2 (CANAPEP 2018). Esto ha generado ganancias económicas al sector piñero, pero a su vez, ha traído constantes señalamientos de ser una actividad con mucho impacto ambiental; principalmente se ha puntualizado en la inadecuada dosificación y uso excesivo de pesticidas como prácticas que atentan contra el medio ambiente (Montiel 2015).

La producción de piña, como toda actividad agrícola, presenta diversos problemas patológicos, entre los cuales destacan los causados por patógenos de suelo de los géneros: *Pythium* spp., *Sclerotium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Erwinia* spp., los cuales afectan el rendimiento y la calidad de la fruta (Arias 2016).

Fusarium sp. en piña ha afectado en gran magnitud la producción de piña en países de Suramérica, como, Brasil, Bolivia y Argentina (Ploetz 2006). Dentro del género *Fusarium* se ha encontrado a la especie *F. oxysporum* Schltdl. asociada a plantas enfermas de piña. La enfermedad afecta todos los órganos de la planta, sin embargo, el principal ataque se da en la raíz y la fruta, razón por la cual su combate se realiza durante todo el ciclo de cultivo (Ploetz 2006).

El combate químico de la enfermedad, se basa en la utilización de un grupo reducido de ingredientes activos y estrategias de uso en campo (Hernández *et al.* 2010). Por lo tanto, si se utilizan estos productos de manera errónea, como lo es aplicaciones repetidas de una misma molécula en un solo año o por varios años consecutivos, ocurre la selección de microorganismos resistentes al producto, generando enfermedades fúngicas con una mayor incidencia, si se comparan con el daño al inicio del uso de la molécula (Villa *et al.* 2015).

Según Fishel y Dewdney (2012), las razones más aceptadas por las que se puede presentar resistencia son: “A. siempre existió una pequeña población resistente presente por variación natural, y B. cuando se aplica un pesticida, la población susceptible se controla, pero la población más pequeña y resistente se convierte en una proporción mayor de la población que vuelve a infectar el sitio”.

En la introducción de un nuevo fungicida comercial, la resistencia se puede producir en los dos primeros años de uso, este periodo va a depender de la cantidad de aplicaciones consecutivas que se realice con el mismo fungicida y la presión de selección sobre la población objetivo (Fishel y Dewdney 2012). Para el caso de fungicidas tales como benzimidazoles, triazoles, dicarboximidas y fenilamidas el periodo de detección de resistencia es muy variable, entre los 2 y 20 años dependiendo en las condiciones en que se desarrolle el patógeno (Montesinos 2005).

A principios de los ochentas se dieron fenómenos de resistencia con los carbamatos de metilbenzimidazol (MBC), dicarboximidas y fenilamidas, donde la resistencia surgió en un corto período de tiempo, generando una serie de fracasos en el combate de enfermedades a nivel de campo, principalmente en el moho gris de la

vid, causado por *Botrytis cinerea* Pers. (Russell 2002). Otras investigaciones realizadas en Colombia sobre el combate de *Phytophthora infestans* en el cultivo de papa, mostraron bajos niveles de sensibilidad por algunos de los aislamientos al metalaxyl, fungicida más comúnmente utilizado para el manejo de *P. infestans* (García *et al.* 2008).

Para el combate de *Fusarium* sp. se hacen diversas aplicaciones con distintos grupos de fungicidas. Sin embargo, en Costa Rica el combate se ha realizado principalmente mediante el uso del fungicida carbendazim (Brent y Hollomon 2007). Uno de los problemas que puede presentarse con la utilización de este producto, es que está clasificado como de alto riesgo de resistencia por parte del patógeno, generando la necesidad de estar cuantificando la eficacia biológica para el combate de *F. oxysporum* Schltdl. y así garantizar el uso racional del producto y evitar que aparezca resistencia temprana (Jiménez 2009), por esto se hace necesario contar con otras alternativas de fungicidas.

2. Revisión de literatura

2.1. Generalidades del cultivo de piña

La piña pertenece a la familia Bromeliáceas, del género *Ananas* y la especie *comosus*. Es originaria de América del Sur, centro de origen común de las bromeliáceas, familia compuesta de aproximadamente 46 géneros y 2000 especies (Castañeda 2005). La piña es una planta monocotiledónea, herbácea, perenne, de reproducción asexual a través de hijos (Villegas *et al.* 2007). La reproducción sexual de la piña es compleja, por lo que el 95% del mejoramiento genético se ha realizado por medio de la selección clonal (Castañeda 2005).

La planta posee un sistema radicular muy superficial, por lo que las características físicas del suelo (estructura, aireación, humedad) influyen sobre su crecimiento. El tallo es una estructura fibrosa cubierta de hojas lanceoladas, anclado al suelo por el sistema radicular y mide hasta 30 centímetros de largo. Posee de 30 a 40 hojas en forma de roseta. El grosor de las hojas le confiere la capacidad de retener agua y evitar la pérdida por evapotranspiración de esta (Castañeda 2005).

Al ser una planta perenne, puede medir varios metros de altura, sin embargo, comercialmente no es conveniente que alcancen grandes alturas por las demandas del mercado, ya que solamente se le permiten de dos a tres cosechas como máximo (Villegas *et al.* 2007). La alta productividad de la piña depende del manejo de cada uno de los factores controlables, como el manejo fitosanitario, nutrientes y riego (Crivelli 2017). La densidad de siembra también influye en los rendimientos de producción, en Costa Rica ésta varía según el destino o propósito de la producción; los cuales pueden ser mercado nacional, exportación o agroindustria (Villegas *et al.* 2007).

En Costa Rica la producción comercial se sustenta principalmente en el híbrido MD-2 o Golden, el cual tiene una alta demanda por los mercados, debido a sus cualidades organolépticas y sensoriales (Velásquez 2018; Solano 2015). Además, este híbrido presenta características como: ciclo corto de reproducción comparado con las demás variedades como la Cayena, alto rendimiento por área de siembra y un alto grado de dulzor y jugosidad (Velásquez 2018)

2.2. Requerimientos agroecológicos del cultivo de piña

Los requerimientos agroecológicos para el desarrollo del cultivo de la piña son bastantes amplios, lo que le permite adaptarse a diferentes condiciones.

- **Temperatura:** los rangos favorables oscilan entre los 20° y 30°C, siendo de 25°C a 27°C los óptimos para su desarrollo (Castañeda 2005). Las temperaturas bajas o muy altas provocan una reducción notable en el crecimiento de hojas y la floración, además afecta la maduración y calidad del fruto (Sánchez 2012).
- **Precipitación:** el cultivo es poco exigente en cuanto a la precipitación, pero se debe considerar los 12 meses del año, donde se debe disponer de 500 a 2500 milímetros anuales de lluvia (Castañeda 2005). Tiene gran capacidad de resistir épocas secas, sin embargo, en periodos largos de sequía se retarda el crecimiento de la planta y se reduce el tamaño de la fruta (Sánchez 2012).

- **Luminosidad:** la alta luminosidad aumenta los rendimientos, favorece la coloración de la cáscara y calidad del fruto, en donde lo óptimo es alcanzar 100 horas luz promedio (Sánchez 2012). Las intensidades muy fuertes de luz provocan quemaduras en toda la planta.
- **Vientos:** estos no deben ser mayores a 50km/h (Cerrato 2013). Largos períodos de viento disminuyen hasta un 25% el crecimiento, más cuando van acompañados por lluvias, provocando lesiones o rupturas que favorecen el ingreso de patógenos (Sánchez 2012).
- **Suelos:** los suelos más apropiados son los de origen volcánico o un suelo franco arenoso, ambos con buen drenaje natural. Se requieren terrenos planos o uniformes, con pendientes menores al 5% (Villegas *et al.* 2007). Los factores del suelo que más limita el crecimiento y desarrollo del cultivo en zonas lluviosas son el mal drenaje y la baja permeabilidad, favoreciendo el ataque de patógenos en el sistema radical (Sánchez 2012).

2.3. Plagas y enfermedades del cultivo de la piña

La piña, como la mayoría de los cultivos, presenta problemas fitosanitarios durante todas sus etapas fenológicas, reduciendo la producción y afectando su sostenibilidad. A nivel de suelo las plagas más importantes que afectan a la piña son los sinfílicos y caracoles; en cuanto a las plagas aéreas se pueden mencionar principalmente: *Dysmicoccus brevipes* (cochinilla), *Strymon basilides* (techla), *Metamasius dimidiatipennis* (picudo) y *Elaphria nucicolora* (gusano soldado) (Chaves 2018).

Dentro de las enfermedades más relevantes asociadas al cultivo de la piña se encuentran: *Phytophthora* spp., *Erwinia* sp., *Fusarium oxysporum*, y *Thelaviopsis paradoxa* (Chaves 2018). Existen otras enfermedades que se desarrollan en la etapa de poscosecha, como por ejemplo daños causados por los hongos *Penicillium* sp, *Talaromyces* sp, *Aspergillus* sp. y *Cladosporium* sp, que de igual manera generan pérdidas importantes de producción (Chaves 2018). Además, estudios realizados en Costa Rica durante esta etapa, se han encontrado hongos de los

géneros: *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. asociados al pedúnculo de la piña (Castro y Umaña 2015).

2.4. Generalidades de *Fusarium* spp

El hongo *Fusarium* fue descrito por Link en 1809 y presenta una amplia distribución mundial, lo que lo hace uno de los géneros que más afecta patológicamente a las plantas (Singleton y Sainsbury 2006). La mayoría de las plantas tienen al menos una enfermedad asociada a este patógeno (Leslie y Summerell 2006), lo cual genera pérdidas económicas considerables, debido a que una vez que ataca al hospedante, los daños son de carácter irreversibles (Villa *et al.* 2015; García *et al.* 2007). El género *Fusarium* es difícil de identificar con relación a la especie, debido a que presenta gran variabilidad en cuanto a sus características fisiológicas y morfológicas (Monzón y Rodríguez 1997).

Fusarium se considera un género anamórfico dentro de los ascomicetos (Monzón y Rodríguez 1997), con habilidad saprofítica, que le confiere una sobrevivencia tanto en el suelo como en materia orgánica por prolongados periodos de tiempo, por lo que se considera saprófito facultativo, capaz de ingresar en el interior de la planta aún en ausencia de heridas (Arias 2016). Algunos autores mencionan que la mayoría de sus cepas tienden a ser débiles o altamente patogénicas para plantas e invertebrados (Singleton y Sainsbury 2006).

Este hongo forma un micelio septado, produce microconidios, macroconidios y clamidosporas (figura 1). Los microconidios se producen en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides (Monzón y Rodríguez 1997), siendo en su gran mayoría, unicelulares, de forma esférica u ovoides (Singleton y Sainsbury 2006). Los macroconidios se producen en sucesión basipetal a partir de las monofiálides, también se producen en esporodoquios, que pueden tener monofiálides o polifiálides (Monzón y Rodríguez 1997), estos son hialinos, multiseptados con forma de media luna (Singleton y Sainsbury 2006). Las clamidosporas se originan por la modificación de un segmento de hifa (Monzón y Rodríguez 1997), poseen paredes gruesas, que les confiere resistencia a condiciones ambientales desfavorables y a la ausencia de hospederos (Murillo 2007).

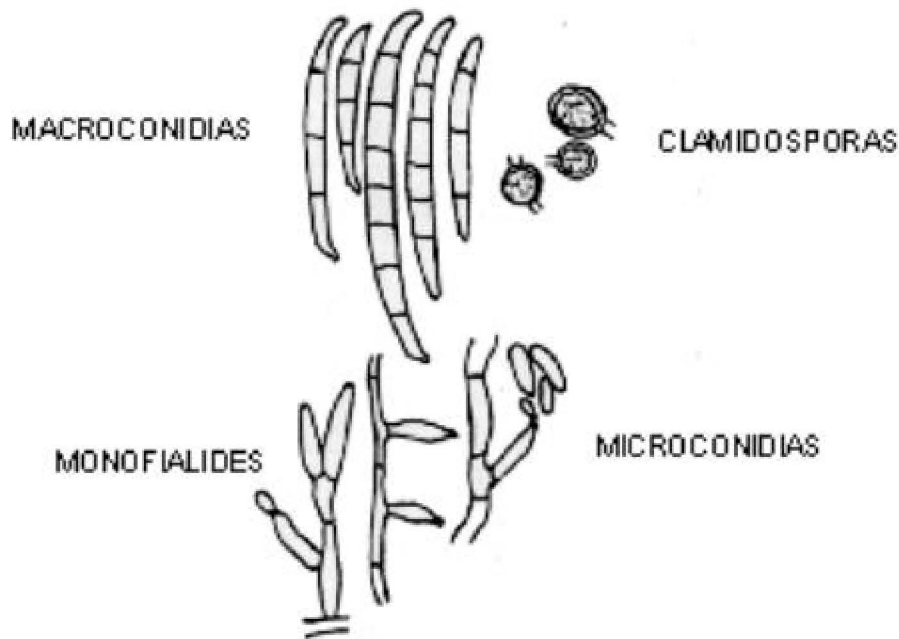


Figura 1. Características microscópicas de *Fusarium oxysporum*. Fuente: Monzón y Rodríguez 1997.

Entre los mecanismos de dispersión que presenta *Fusarium* sp. se pueden mencionar; movimientos de suelo infectado, escurrimiento de agua y material contaminado con este patógeno (semillas, material vegetal) (Retana *et al.* 2018). Aunque este patógeno puede atacar e ingresar a la planta en ausencia de heridas, su presencia en el campo tiene relación con factores que ocasionan algún tipo de estrés en la raíz, como apoxia, anoxia o daños mecánicos (Arias 2016).

Las condiciones climáticas para el desarrollo del hongo en las plantaciones son, temperaturas entre los 23°C y los 28°C, alta humedad relativa y la presencia de muchas lluvias (Murillo 2007). El hongo presenta una amplia gama de hospedantes, en el caso de la piña puede sobrevivir en toda la planta desde la raíz hasta el fruto, además sobrevive en materia orgánica o en el suelo por medio de las clamidosporas, por lo que una vez establecido es considerado difícil de erradicar (Murillo 2007).

Algunos métodos de combate de *Fusarium* sp. se basan en realizar una correcta preparación del terreno, como lo es la reducción del exceso de humedad con la

incorporación del mismo rastrojo de la plantación libre de patógenos, realizar aplicaciones con fungicidas o biocontroladores, en la preparación del terreno o etapas iniciales del desarrollo de cultivos (Murillo 2007).

2.5. *Fusarium* sp. en piña

El patógeno presenta una alta incidencia en las plantaciones y mundialmente existen especies muy agresivas, por ejemplo, la alta incidencia de la especie *Fusarium guttiforme* ha causado grandes problemas en Brasil, provocando el cierre de plantaciones (Arias 2016). En Costa Rica, la especie que se ha encontrado es *F. oxysporum*, asociado como patógeno en el cultivo de piña, y al cual se le han realizado pruebas moleculares para su identificación (Umaña 2018; Jiménez 2009)

Los síntomas causados por *Fusarium* sp. a nivel de campo se presentan como una podredumbre en la planta, en donde se observa una coloración amarillenta en el tallo y necrosis del tejido, el sistema radical afectado por el patógeno presenta una disminución en el desarrollo y funcionalidad (Murillo 2007). A nivel de follaje se presenta una clorosis en las hojas basales y en las apicales, además ocurre una deshidratación foliar similar al déficit hídrico (Murillo 2007). En cuanto a la fruta, *Fusarium* sp. provoca un desarrollo pobre con piñas de menor tamaño, además, si se presenta en asocio con otros patógenos, se puede afectar la calidad interna de la fruta (Murillo 2007).

Otros síntomas secundarios que se presentan a causa de *Fusarium* sp., son la curvatura de la planta; formación de rosetas de las hojas, aumento en el número de hojas por espiral; reducción del tamaño y la longitud de la hoja; muerte del punto de crecimiento terminal y clorosis (Rohrbach y Schmitt 2003; de Matos y Mourichon 1993; Pissarra *et al.* 1979).

2.6. Fungicidas usados para el combate de *Fusarium* spp

Algunas de las alternativas para el combate de *Fusarium* están basadas en las prácticas culturales propias de cada cultivo y en el uso de fungicidas, aplicados en estados tempranos de desarrollo de los cultivos (Villa *et al.* 2015).

El combate químico es el método más utilizado, debido a su bajo costo económico y por ser eficaz, sin embargo, su actividad, ya sea fungistática o fungicida, va a depender de la configuración molecular propia del fungicida y de la estructura celular del hongo, así como también su acción inhibitoria dependerá de la concentración que se utilice (Villa *et al.* 2015; Rubio *et al.* 2008). Para el combate de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. se utilizan algunos fungicidas sistémicos como los benzimidazoles; dentro de los cuales se incluye el benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato de metilo (Villa *et al.* 2015; Agrios 2005).

En el caso de *F. oxysporum*, se clasificó moderadamente resistente a carbendazim, azoxystrobin, tebuconazole (Rubio *et al.* 2008; Novaes *et al.* 2005). Por otro lado, utilizando métodos como el tratamiento de inmersión de raíz, el benomil fue parcialmente eficaz contra *F. oxysporum* (Ajilogba y Babalola 2013; Nel *et al.* 2007), en donde se aplicó a plántulas de tomate, aumentando el rendimiento alrededor de 24% (Ajilogba y Babalola 2013; Khan y Khan 2002). Según Jiménez (2009), en Costa Rica sólo se cuenta con el registro de dos ingredientes activos, carbendazim y el triadimefon, que son utilizados como tratamiento preventivo en el combate de *Fusarium* sp. en piña. Sin embargo, actualmente también se encuentra registrado el propiconazole y epoxiconazole (SFE 2019).

El triadimefon, el propiconazole y epoxiconazole pertenecen al grupo químico de los triazoles (Inhibidores de la Desmetilación-C14, DMI), siendo esta la clase más grande de fungicidas (Morton y Staub 2008). Los triazoles son compuestos de penetración y translocación, se movilizan por medio del xilema, actuando parcialmente como protectores, mediante un efecto tóxico en la germinación de esporas y tubo germinal, pero su acción principal es como fungicida curativo al inhibir el desarrollo del haustorio y / o el desarrollo micelial dentro del hospedero (Bérgamo 2016).

Además, los triazoles son fungicidas que inhiben la biosíntesis del ergosterol que es el mayor esterol en los hongos (Secor y Rivera 2012). Los esteroides derivan de los terpenos y son una parte muy importante de las membranas de las células de

los hongos, lo cual les permite estabilidad haciéndolas flexibles y permitiendo el control de la permeabilidad (Secor y Rivera 2012).

Los triazoles son uno de los grupos más importantes de fungicidas, sin embargo, los productos pertenecientes a este grupo no son efectivos para el combate de Oomycetes, debido a que los Oomycetes no poseen la vía de síntesis del ergosterol (Cordo *et al.* 2017). Además, algunos autores mencionan que estos fungicidas suelen ser más efectivos en las primeras etapas del proceso de infección del patógeno, cuando se necesita la germinación de esporas y el crecimiento de tubo germinativo para una infección exitosa. Otros autores mencionan que los DMI no logran suprimir por completo la germinación de esporas al ergosterol constitutivo presente en la célula, el principal efecto de los DMI está en el tubo germinal y el crecimiento de hifas (Pérez 2013 y Klix *et al.* 2007).

Debido a lo anterior, las pruebas de monitoreo de sensibilidad del grupo DMI se basan en inhibición del crecimiento del tubo germinal de esporas a diferentes concentraciones (Pérez 2013). Sin embargo, algunos autores mencionan que estos fungicidas también inhiben el crecimiento micelial, por tal razón, en la mayoría de bioensayos *in vitro* se utiliza la inhibición del crecimiento radial de colonias, esto como herramienta para medir la resistencia a los fungicidas (Secor y Rivera 2012).

El carbendazim es del grupo químico de los benzimidazoles (carbamatos de metilbenzimidazol, MBC), los cuales se introdujeron a finales de los años sesenta e inicio de los setenta para el combate de enfermedades en plantas, utilizándose como fungicidas foliares, tratamientos de semillas y aplicaciones en poscosecha (Morton y Staub 2008). El carbendazim es un fungicida sistémico, curativo y preventivo de amplio espectro. Este fungicida bloquea la formación de los microtúbulos, inhibiendo la mitosis afectando la formación del tubo germinativo y apresorio, así como el crecimiento micelial (Bérgamo 2016 y Jiménez 2009).

Dentro de otros grupos químicos de fungicidas para el combate de *Fusarium* sp. en piña, no autorizados en Costa Rica, se encuentran actualmente las spiroquetalaminas y las estrobirulinas, estos tienen efectos biocidas sobre deuteromicetes (Jiménez 2009). En Venezuela también se han realizado estudios

utilizando los fungicidas benomil y procloraz, para evaluar la eficacia biológica, de los cuales se han obtenido resultados positivos en la inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. (Jiménez 2009).

Mansilla *et al.* (2010), demostraron que el triadimenol tiene una eficacia del 76,2 % contra hongos fitopatógenos como *Fusarium subglutinans*, esto en el cultivo de la piña sembrada en viveros, por otra parte, menciona que productos con porcentajes de eficacia menores a 50 podrían no ser adecuados para utilizarlos en el combate de *Fusarium*.

2.7. Evaluación de la eficacia de los fungicidas a nivel *in vitro*

Las evaluaciones de eficacia permiten determinar los efectos que tiene un producto fitosanitario sobre el crecimiento de un patógeno determinado. Las evaluaciones en campo de eficacia son complejas y presentan muchas interferencias. Por otra parte, los ensayos *in vitro* de eficacia muestran cuáles son los mejores productos, sin embargo, dan una estimación indirecta del valor práctico del producto, por lo que se debe constatar posteriormente en campo (González 2005).

Los ensayos *in vitro* de eficacia se basan en la confrontación del hongo con concentraciones crecientes del fungicida. El enfrentamiento se puede realizar mediante dos métodos; añadiendo las concentraciones de producto en medios de cultivo, que permitan estimar el efecto del producto sobre el crecimiento del micelio, o también la exposición directa de una suspensión de esporas o conidios del hongo con el producto, para así estimar el efecto sobre la germinación de esporas o conidios. En ambos casos las mediciones del efecto del fungicida se estiman con respecto al testigo sin tratar (González 2005).

Cuando se incorporan fungicidas en agar u otros medios, donde la preparación tiene que ser esterilizada, se debe tener cuidado que los fungicidas no pierdan las propiedades fisicoquímicas. El fungicida puede añadirse antes de la esterilización en la autoclave si esto es posible, de lo contrario debe añadirse justo antes del inicio de la prueba usando técnicas estériles apropiadas. Otro factor a considerar es la viabilidad del patógeno, se utilizan individuos libres de impurezas (no

contaminados), esto para evitar resultados erróneos al momento de realizar las evaluaciones (Russell 2002).

Las evaluaciones del procedimiento dependerán del objetivo de cada prueba que se realice y del modo de acción de los fungicidas. Las condiciones del ensayo y la duración del mismo deben estar normalizadas para garantizar la repetitividad, las cuales van a depender del material con que se trabaje y el objetivo del ensayo (Russell 2002).

En ensayos *in vitro*, *F. oxysporum* presenta un crecimiento rápido, de al menos 50 mm de diámetro en una semana. Al inicio, la colonia es lisa y algodonosa, luego toma un aspecto como el fieltro, de color blanco o salmón pálido, tiñéndose de púrpura en su zona central, en el reverso es púrpura o azul oscuro. Además, la formación de las conidias se pueden estimular incubando el medio de cultivo bajo luz negra (300-400 nm) y también alternando luz y temperatura (25 °C día/20 °C noche) (Monzón y Rodríguez 1997).

3. Objetivo general:

Evaluar preliminarmente la eficacia de tres fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* asociado a plantas enfermas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), con el fin utilizar esta información en estudios futuros.

4. Objetivos específicos:

Determinar la eficacia a nivel "*in vitro*", de tres fungicidas, a diferentes concentraciones, sobre varios aislamientos de *F. oxysporum* aislado de plantas enfermas de piña.

5. Metodología:

5.1. Sitio experimental

La prueba de eficacia *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC) y en el Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, ubicados en San Pedro, Montes de Oca, San José, Costa Rica.

5.2. Material experimental

En el estudio se utilizaron cinco aislamientos monospóricos del hongo *Fusarium oxysporum sensu lato*, aislados de plantas enfermas de piña, provenientes de diferentes áreas de producción (Cuadro 1). Estos aislamientos se encontraban en la micoteca del Laboratorio de Fitopatología, donde estaban almacenados a una temperatura de -80°C, por un periodo aproximado de un año. A estos, se les habían realizado pruebas moleculares para confirmar su identificación a nivel de especie. Se utilizó *F. oxysporum* debido a su alta agresividad y frecuencia de aparición en plantas enfermas de piña, esto con base en estudios previos realizados en los laboratorios del CIPROC (datos sin publicar) y conforme a la experiencia del sector piñero.

Se probaron tres fungicidas comercialmente usados para el combate de *Fusarium* sp. en el cultivo de piña: carbendazim, propiconazole y epoxiconazole.

Cuadro 1. Descripción de los aislamientos evaluados según el tejido a partir del cual se realizó el aislamiento y la región de donde se recolectaron. San Pedro, Costa Rica, 2019.

Aislamiento	Código de Identificación	Tejido de donde se aisló	Región de dónde provenía el material analizado
1	Fpi19	Primordio	San Luis, Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica
2	Fpi48	Raíz	La Legua, Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica
3	Fpi9	Raíz	Llano Grande, Sarapiquí, Heredia Costa Rica
4	Fpi2	Follaje	Puerto Viejo, Sarapiquí, Heredia Costa Rica
5	Fpi17	Base tallo	La Legua, Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica

El material utilizado pertenece a muestreos realizados por el personal del Servicio Fitosanitario del Estado (SFE), quienes recolectaron material que se relacionaba con la enfermedad que en el campo se conoce como “amarillón”.

5.3. Tratamientos evaluados

Se siguió los lineamientos descritos por Masiello y colaboradores (2019) para determinar las concentraciones de los productos comerciales, quienes sugieren utilizar la dosis comercial (DC), recomendada por el formulador, una décima (DC/10) y una centésima (DC/100) parte de ésta.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la prueba de eficacia de fungicidas contra el hongo *Fusarium oxysporum* aislado de plantas de piña enfermas. San Pedro, Costa Rica, 2019.

Ingrediente activo del fungicida	Concentración del producto comercial (ppm)	Dosis comercial para aplicar por hectárea	Concentraciones para evaluar <i>in vitro</i> (ppm)		
			DC	DC/10	DC/100
Carbendazim	500.000	5 L/Ha, en 4000 L de agua (625 ppm)	625	62,5	6,25
Epoxiconazole	75.000	1,5 L/Ha, en 2500 L de agua (45 ppm)	45	4,5	0,45
Propiconazole	250.000	5 L/Ha, en 4000 L de agua (312,5 ppm)	312,5	31,25	3,125

DC: dosis comercial, DC/10: décima parte dosis comercial, DC/100: centésima parte dosis comercial.

Los tratamientos descritos en el cuadro anterior, se aplicaron en los cinco aislamientos monospóricos descritos anteriormente. Se obtuvo un total de 45 tratamientos al combinar los diferentes factores (aislamiento, fungicida y dosis), más un tratamiento testigo al cual no se le aplicó ningún tipo de fungicida. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones.

5.4. Propagación del hongo *Fusarium oxysporum*

Los aislamientos del hongo que se encontraban en refrigeración (-80°C), se activaron al colocar trozos de papel con micelio en platos Petri con medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) para su crecimiento. Luego que esporularon, se cortó un disco de 5 mm y se introdujo en 3 mL de agua destilada estéril para realizar una suspensión de esporas. Se tomó una alícuota de 0,1 mL de esta suspensión y se depositó en un plato Petri con un medio PDA con ácido láctico (PDA+), y se rayó con un asa de Drigalski triangular estéril. Los platos Petri se incubaron a 26°C en oscuridad continua por 5 días.

5.5. Métodos de evaluación de eficacia

Para evaluar la eficacia de los tratamientos establecidos se llevaron a cabo dos metodologías; crecimiento radial del hongo y germinación de esporas y longitud de tubo germinativo.

5.5.1. Crecimiento radial

5.5.1.1. Medio enmendado con sus diferentes concentraciones de los fungicidas

En medios de cultivo PDA+ previamente esterilizados sin gelificar, a una temperatura de aproximadamente 40-45°C, en la cámara de flujo laminar, se les agregó las diferentes concentraciones de fungicidas correspondientes para cada tratamiento, y posteriormente se dispensaron en platos Petri estériles para su solidificación.

5.5.1.2. Producción de inóculo de *F. oxysporum*

Una vez que hubo un crecimiento micelial visible de cada aislamiento propagado (apartado 5.4), se preparó una solución de 50 mL de agua destilada estéril con una gota de Tween 80. De esta solución se tomaron 15 mL y se agregó al plato Petri con el patógeno en crecimiento, se agitó suavemente con una espátula plástica para desprender los conidios. Esta suspensión de esporas se volvió a depositar en la solución original y se agitó, de esta suspensión se tomaron 10 mL y se colocó en 40 mL de medio de cultivo de PDA estéril sin gelificar, con el fin de incorporar esas esporas dentro del medio y lograr un crecimiento rápido y uniforme del inóculo. Se dispensaron aproximadamente 15 mL del medio enmendado con el patógeno por plato Petri para que gelificara y éste se utilizó este como inóculo.

5.5.1.3. Inoculación del hongo en los platos enmendados con fungicida

Para realizar la inoculación del cultivo puro (crecimiento de un solo tipo de organismo) de los aislamientos de *F. oxysporum*, de estos se cortaron discos de 5 mm de diámetro y con la ayuda de una aguja micológica se colocó uno en el centro de cada plato Petri con el tratamiento a evaluar. Los platos Petri se incubaron (incubadora DIGISYSTEM, modelo LE-509RD) a 26°C en oscuridad continua.

5.5.1.4. Evaluación del crecimiento radial

Se realizó una única evaluación cuando el crecimiento del patógeno en el tratamiento testigo obtuvo un 100% de la cobertura del plato Petri. Se midió el crecimiento radial de los demás tratamientos con la ayuda de un calibrador vernier. El crecimiento radial se evaluó haciendo dos mediciones perpendiculares a través de la colonia y promediando los diámetros. Con estos datos se estimó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), mediante la siguiente fórmula utilizada por Kimaru *et al.* (2018):

$$\text{PIC} = \left(\frac{C1 - C2}{C1} \right) \times 100$$

Donde:

C1= Crecimiento radial del testigo

C2= Crecimiento radial del hongo en los tratamientos.

5.5.2. Germinación de esporas y longitud del tubo germinativo

5.5.2.1. Producción de inóculo de *F. oxysporum*

Una vez que hubo un crecimiento micelial visible de cada aislamiento (apartado 5.4), se preparó una solución de 50 mL de agua destilada estéril con 1 gota de Tween 80. De esta solución se tomó 15 mL y se agregó al plato Petri con el patógeno en crecimiento, se agitó suavemente con una espátula plástica para desprender los conidios. Esta suspensión de esporas se volvió a depositar en la solución original. De esta última se realizaron diluciones hasta obtener una concentración de 2×10^5 conidios/mL, según metodología descrita por French y Hebert (1980).

5.5.2.2. Exposición de los conidios a las concentraciones de fungicidas a evaluar

En un portaobjeto se adicionaron 20 μL de la suspensión de conidios a una concentración de 2×10^5 conidios/mL del respectivo aislamiento de *F. oxysporum*. Sobre esta se agregó la misma cantidad de una solución fungicida, cuya concentración fue el doble de la que se deseaba evaluar. Al unirse ambas gotas se

obtuvo una suspensión de 1×10^5 conidios/mL expuesta a la concentración de fungicida que se detallan en el cuadro 2. Los portaobjetos se incubaron en oscuridad a 26°C durante 20 horas (Rivero *et al.* 2004). Una vez cumplido el periodo de incubación se colocaron en refrigeración a 7°C para detener el crecimiento.

5.5.2.3. Evaluación de germinación y longitud del tubo germinativo.

a) Evaluación de la germinación de la espora

Con el fin de teñir las esporas del hongo y detener la germinación (Marín y Bustillo 2002), se le agregó una gota de azul de lactofenol a cada tratamiento. Se observaron 50 conidios por repetición con ayuda de un microscopio 310E Moticam 580 INT (lente objetivo 40X). Para la evaluación se clasificó la germinación de las esporas en tres categorías (figura 2): 1. Germinación normal (se consideró germinación normal cuando el tubo germinativo alcanzó el doble de la longitud del conidio (Osorio *et al.* 2012)), 2. Tubo corto (longitud de tubo menor al doble del tamaño de la espora) y 3. No germinado.

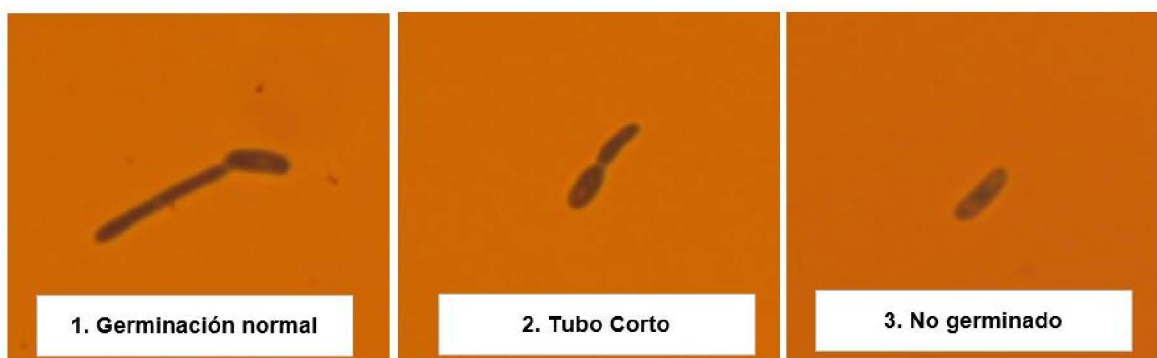


Figura 2. Clasificación de la germinación de esporas de *F. oxysporum* expuestas a diferentes concentraciones del fungicida carbendazim. San Pedro, Costa Rica, 2019.

Una vez realizadas las mediciones con los datos se estimó el porcentaje de germinación del hongo contando al azar 50 conidios de cada portaobjeto y se determinó la proporción de germinación por categoría con respecto al total observado.

b) Evaluación de la longitud del tubo germinativo de la espora

Se evaluó la variable longitud del tubo germinativo para los tratamientos donde se utilizaron los fungicidas propiconazole y epoxiconazole, debido a que estos inhiben la biosíntesis del ergosterol (Secor y Rivera 2012). Se le agregó una gota de azul de lactofenol a cada tratamiento, con el fin de teñir las esporas del hongo y detener la germinación (Marín y Bustillo, 2002). Se observaron 50 conidios por repetición con ayuda de un microscopio 310E Moticam 580 INT (lente objetivo 40X), en donde se capturaron fotografías que mostraran la cantidad de conidios a evaluar. Con las fotografías se midió la longitud (en micras) del tubo germinativo, con ayuda del programa IMAGEJ 1.52a, en donde se tomaron en cuenta solamente las esporas germinadas (Figura 3).

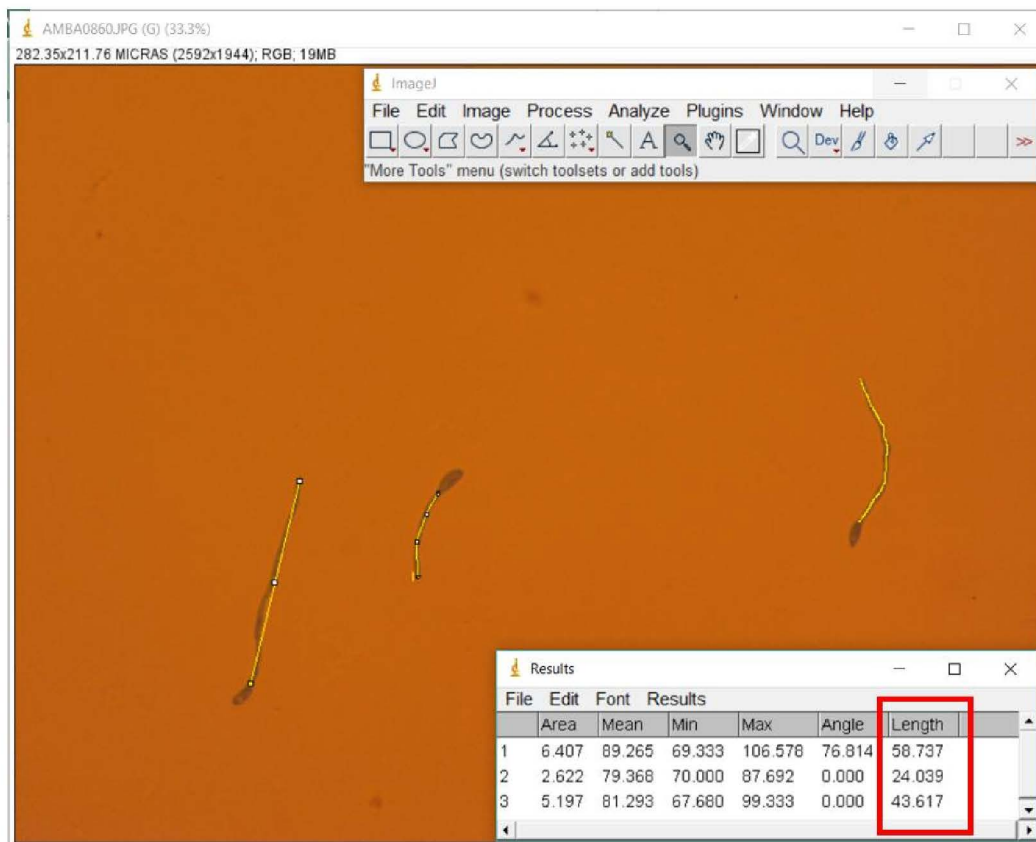


Figura 3. Programa IMAGEJ 1.52a utilizado para la medición de la longitud del tubo germinativo de esporas de *Fusarium oxysporum*, aislado de plantas enfermas de piña, expuestas a los fungicidas propiconazole y epoxiconazole. San Pedro, Costa Rica, 2019.

Una vez realizadas las mediciones se estimó el porcentaje de inhibición de longitud del tubo germinativo (PILT) comparados con el testigo, mediante la siguiente fórmula adaptada de Kimaru *et al.* (2018):

$$\text{PILT} = \left(\frac{L1 - L2}{L1} \right) \times 100$$

Donde:

L1= Longitud de tubo germinativo del testigo

L2= Longitud de tubo germinativo del hongo en los tratamientos

5.6. Diseño experimental

Se estableció un diseño irrestricto al azar, en donde se compararon los resultados obtenidos mediante la interacción dosis por aislamiento, para cada uno de los diferentes fungicidas evaluados, mediante un arreglo factorial.

Para los datos obtenidos de las variables diámetro de colonia, germinación de esporas y longitud de tubo germinativo este último evaluando el epoxiconazole, en donde cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se les realizó un análisis de varianza clásica y se utilizó una prueba Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) para ver diferencias significativas entre medias, con un rango de confianza del 95%.

Para la variable longitud de tubo germinativo evaluando el propiconazole, que no cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se realizó un análisis de varianza mediante un modelo lineal generalizado y mixto y se utilizó una prueba Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) para ver diferencias significativas entre medias, con un rango de confianza del 95%.

Para los análisis se utilizó el programa estadístico infoStat, versión 2018.

6. Resultados

6.1. Crecimiento de diámetro de colonia

La exposición del hongo *F. oxysporum* a los fungicidas en medio de cultivo enmendado con diferentes concentraciones, tuvo un efecto en la reducción del crecimiento del diámetro de colonia de los aislamientos.

6.1.1. Fungicida carbendazim

Al analizar el efecto del fungicida carbendazim a tres concentraciones diferentes, el porcentaje de reducción del diámetro de colonia fue del 100%, para cada una de estas. En la figura 4 se puede observar la inhibición total del crecimiento del micelio, esta inhibición se observó en todos los aislamientos evaluados.

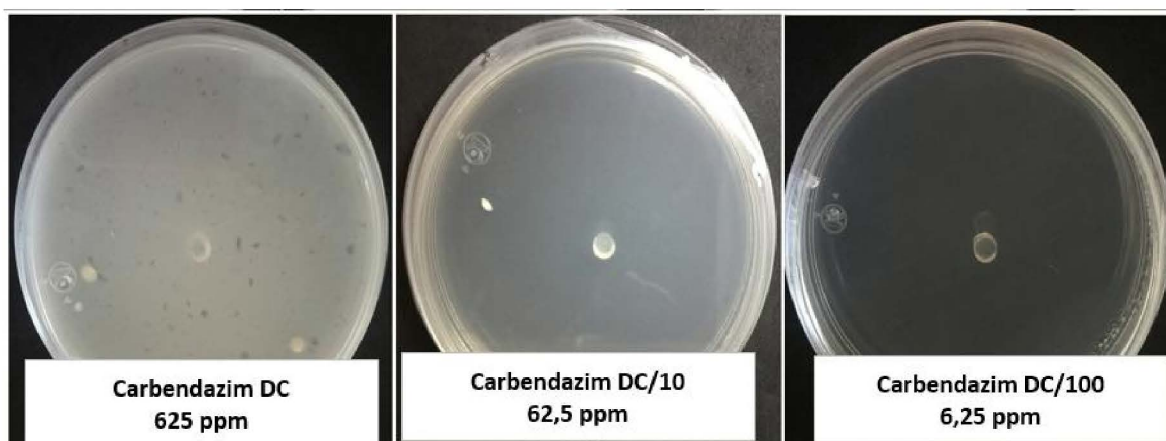


Figura 4. Inhibición de crecimiento micelial de *F. oxysporum* “*in vitro*” en medio de cultivo enmendado con el fungicida carbendazim; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 625 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 62,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 6,25 ppm.

6.1.2. Fungicida Epoxiconazole

Al exponer los aislamientos al fungicida epoxiconazole se encontraron diferencias significativas tanto en concentraciones como entre aislamientos de *F. oxysporum* (Figura 5). Con respecto a la concentración de la dosis comercial (DC) no hubo diferencias significativas entre los cinco aislamientos en donde el porcentaje de reducción de diámetro de colonia fue del 100%. Para la dosis comercial a la décima

parte (DC/10) sí hubo diferencias entre aislamientos, en donde el mayor porcentaje de reducción lo obtuvieron los aislamientos tres y cuatro, con 99.4% y 100% respectivamente. Estos dos aislamientos no presentaron diferencias con los resultados obtenidos en la DC. El aislamiento dos presentó el menor porcentaje de reducción de diámetro con un 85% para la DC/10.

Para el caso de la dosis comercial de epoxiconazole a la centésima parte (DC/100) se observó diferencias entre aislamientos y concentraciones. La mayor reducción del diámetro de colonia se mostró en el aislamiento cuatro con un 78.8 %, seguidos por los aislamientos dos y cinco obtuvieron porcentajes de reducción de 69.2% y 71.2% respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre ambos y colocándose en un nivel intermedio de reducción en comparación con los demás aislamientos. En cuanto a los aislamientos uno y tres presentaron los menores porcentajes de reducción, con 63.6% y 64.6% cada uno.

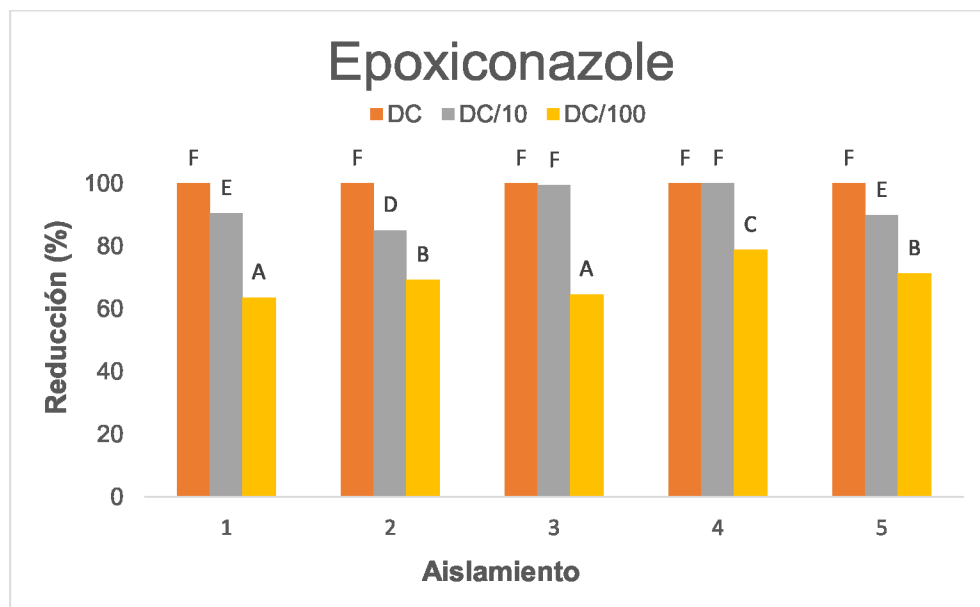


Figura 5. Porcentaje de reducción de crecimiento micelial de *F. oxysporum* “*in vitro*” en medio de cultivo enmendado con el fungicida epoxiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 45 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 4,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 0,45 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según análisis de varianza y comparación de medias con la prueba DGC.

6.1.3. Fungicida propiconazole

El propiconazole no mostró diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento de colonia entre aislamientos cuando se utilizó la DC, siendo los porcentajes de reducción mayores al 99.6% (figura 6). En los tratamientos utilizando la DC/10, el aislamiento cuatro obtuvo un 100% de reducción, en donde no se observó diferencias significativas con los tratamientos de DC. Los aislamientos uno y tres no presentaron diferencias entre ellos utilizando la DC/10, obteniendo una reducción de 95% y 97.4% respectivamente, mientras que los aislamientos dos y cinco fueron los menos susceptibles, 85.4 % y 88.0% correspondientemente.

Para el caso de los tratamientos en donde se utilizó el propiconazole a una concentración de DC/100, se obtuvieron porcentajes de reducción del crecimiento de colonia de *F. oxysporum* entre el 69.0% a 79.2%. En el caso del aislamiento cuatro, este fue el más susceptible a esta concentración, los aislamientos uno, dos y tres no presentaron diferencias significativas entre ellos y el menor porcentaje de reducción se presentó en el aislamiento cinco con un 69%.

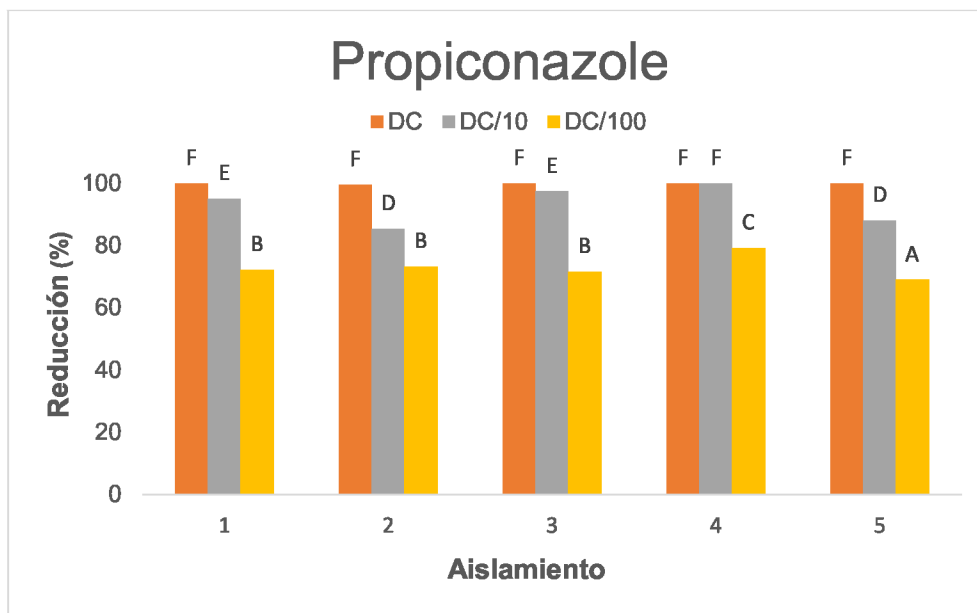


Figura 6. Porcentaje de reducción de crecimiento micelial de *F. oxysporum* “in vitro” en medio de cultivo enmendado con el fungicida propiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 312,5 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 31,25 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 3,125 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según análisis de varianza y comparación de medias con la prueba DGC.

Los resultados reflejaron que ninguno de los tratamientos probados *F. oxysporum* alcanzó a cubrir más de la mitad del medio de cultivo. Sin embargo, se observó una leve tendencia creciente entre la inhibición en el crecimiento del micelio con respecto al aumento en la concentración de los fungicidas probados.

6.2. Germinación de esporas y longitud del tubo germinativo

La exposición de los conidios de *F. oxysporum* a las diferentes concentraciones de fungicidas, provocó un efecto de reducción del porcentaje de germinación, esto se comprobó al evaluar la cantidad de conidios con germinación normal, tubo germinativo corto o que no germinaron, al utilizar carbendazim y para el caso de epoxiconazole y propiconazole, provocó un efecto de reducción en la longitud del tubo germinativo.

6.2.1. Fungicida Carbendazim

En la figura 7 se muestra el comportamiento de las variables: germinación normal, tubo germinativo corto y conidios sin germinar para el tratamiento testigo y las diferentes dosis del fungicida, de los cinco aislamientos. En cuanto al aislamiento uno (figura 7.A) en la germinación normal, hubo diferencias significativas de las diferentes concentraciones en comparación al testigo (49.2%), sin presentar diferencias entre concentraciones, obteniendo porcentajes de germinación normal menores al 1.2%. Para el caso del tubo germinativo corto, no se muestran diferencias significativas en ninguna de las concentraciones utilizadas con respecto al testigo, el cual presentó un porcentaje de 28%. En cuanto a las esporas no germinadas, se presentó un aumento significativo en todas las concentraciones de carbendazim en comparación al testigo, sin haber diferencias entre las concentraciones, presentando porcentajes de conidios no germinados de 75.6% para la DC, 82% para la DC/10 y 75.2% para la DC/100.

Para el caso del aislamiento dos (figura 7.B), al analizar el efecto de las diferentes concentraciones del fungicida sobre la variable germinación normal, se encontró que todas, disminuyeron en forma significativa, al compararlas contra el testigo (27,2%). En el caso de las diferentes concentraciones se detectaron pocas esporas que mostraran una germinación normal.

En el caso de la variable tubo germinativo corto, las diferentes concentraciones mostraron una reducción significativa con respecto al testigo. Para la variable de esporas no germinadas, se presentó un aumento significativo en todas las concentraciones de carbendazim en comparación del testigo, sin diferencias entre las concentraciones, presentando porcentajes entre 93.2% a 98%.

Para el aislamiento tres (figura 7.C), hubo diferencias significativas en cuanto a la germinación normal a las diferentes concentraciones en comparación al testigo (82%), así como entre ellas. La concentración DC/10 mostró un 52%, que fue significativamente diferente de DC y DC/100 con 41.6% y 35.6% respectivamente, las cuales no fueron diferentes entre ellas.

Para el caso de conidios con tubo germinativo corto, se presentaron diferencias significativas entre concentraciones con respecto al testigo. Además, se encontraron diferencias entre la concentración DC/10, mostrando un 42.8% de esporas con tubo germinativo corto y las concentraciones DC y DC/100, 51.2% y 56.4% respectivamente, sin presentar diferencias entre ambas. En cuanto a las esporas no germinadas, no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las concentraciones evaluadas con respecto al testigo.

Para el aislamiento cuatro (figura 7.D) hubo diferencias significativas en el porcentaje de cada uno de los tipos de germinación con respecto a las concentraciones de carbendazim utilizadas. En cuanto a la germinación normal, hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones en comparación al testigo (58%), sin mostrar diferencias entre concentraciones, obteniendo porcentajes de germinación normal de 5.2% para la DC, 8% para la DC/10 y 1.6% para la DC/100.

En la variable de tubo germinativo corto, se muestran diferencias significativas entre las tres concentraciones evaluadas con respecto al testigo, pero sin presentar diferencias entre ellas, obteniendo porcentajes que oscilan entre 58.8 y 65.2%. Para la variable esporas no germinadas, se presentó un aumento significativo en todas las concentraciones de carbendazim en comparación del testigo (8.8%), pero sin diferencias entre las concentraciones.

En cuanto el aislamiento cinco (figura 7.E), en la germinación normal, hubo diferencias significativas de las diferentes concentraciones en comparación al testigo (66.4%), sin haber diferencias entre concentraciones, obteniendo porcentajes de germinación normal entre 2.8% y 10.4%. En la variable de tubo germinativo corto, se muestran diferencias significativas entre las tres concentraciones utilizadas con respecto al testigo, pero sin presentar diferencias entre ellas, con porcentajes de 76.8% para la DC, 75.2% para la DC/10 y 72% para la DC/100.

En cuanto a esporas no germinadas, se presentó un aumento significativo en todas las concentraciones de carbendazim en comparación del testigo (0.8%), sin

presentar diferencias significativas entre concentraciones, con porcentajes de esporas no germinadas entre 17.6% y 22%.

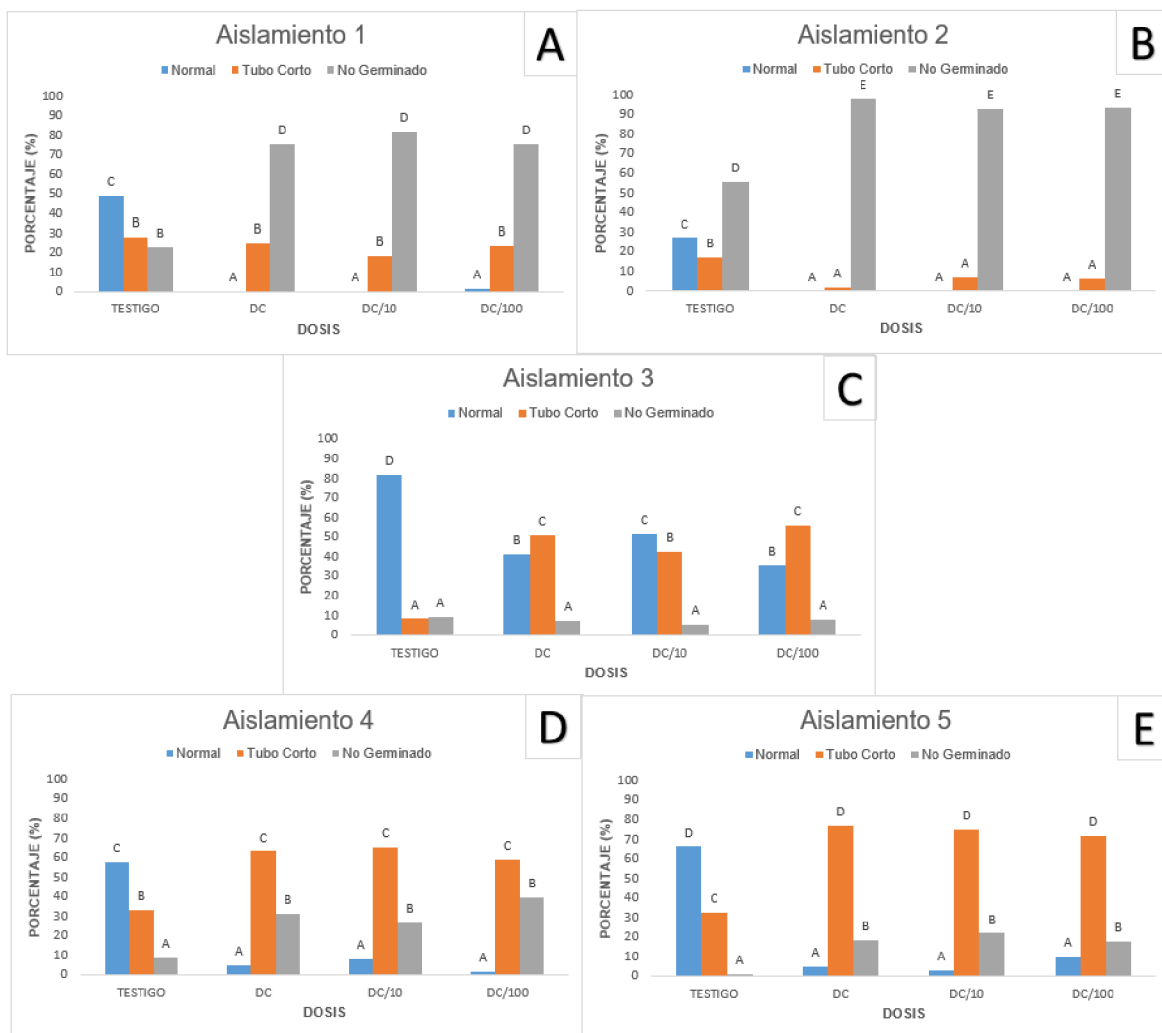


Figura 7. Porcentaje de conidios de *F. oxysporum*, por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) de los cinco aislamientos, al exponerlos a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 625 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 62,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 6,25 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según análisis de varianza y comparación de medias con la prueba DGC.

6.2.2. Fungicida epoxiconazole

Al evaluar el efecto de las diferentes concentraciones del fungicida epoxiconazole sobre la longitud del tubo germinativo de las esporas de diferentes aislamientos de *F. oxysporum* (figura 8), no se encontraron diferencias significativas, ni entre aislamientos ni entre concentraciones. Para la concentración DC los porcentajes de reducción en la longitud del tubo fueron desde 38.8% hasta 67.4%, siendo el aislamiento tres el más susceptible, sin embargo, este no presentó diferencias significativas con respecto a los demás aislamientos. En el caso de DC/10 los porcentajes de reducción mostraron un rango desde 36.7% hasta 61.6%, en donde no hubo diferencias significativas entre aislamientos. En cuanto a la DC/100 los porcentajes fueron de 29.4% hasta 45.3% en la reducción de longitud de tubo germinativo

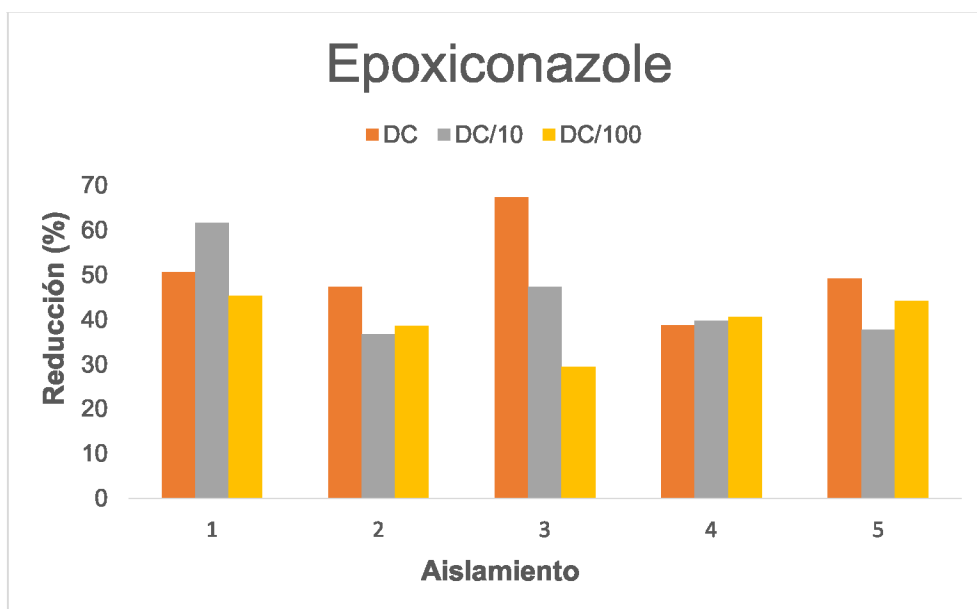


Figura 8. Porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de *F. oxysporum* expuestas a diferentes concentraciones del fungicida epoxiconazole a nivel “*in vitro*”; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 45 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 4,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 0,45 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según análisis de varianza.

6.2.3. Fungicida propiconazole

En la figura 9 se muestran los porcentajes de reducción de longitud del tubo germinativo de las esporas de diferentes aislamientos del hongo *F. oxysporum*, expuestos a tres concentraciones del fungicida propiconazole. Los porcentajes de reducción oscilaron entre 11,3% y 63,7% y no se encontraron diferencias significativas ni entre concentraciones ni aislamientos, a excepción de la concentración DC, el aislamiento cuatro tuvo diferencias significativas con respecto a los demás, con un porcentaje de reducción de 11,3%. En el caso de DC/10 los porcentajes de reducción obtenidos fueron entre un 37,3% y 57,9%, en donde no hubo diferencias significativas entre aislamientos. Para la DC/100 los porcentajes oscilaron valores entre un 36,9% y un 53,1% en la reducción de longitud de tubo germinativo.

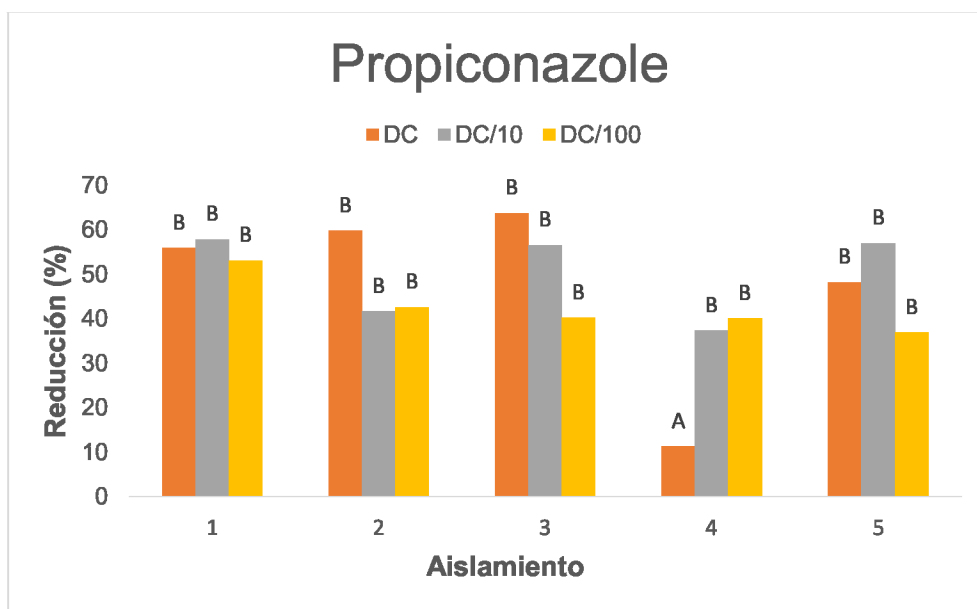


Figura 9. Porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de *F. oxysporum* expuestos a diferentes concentraciones del fungicida propiconazole a nivel “*in vitro*”; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 312,5 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 31,25 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 3,125 ppm. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según análisis de varianza y comparación de medias con la prueba DGC.

7. Discusión

En este estudio se evaluó, la respuesta de cinco aislamientos de *F. oxysporum* obtenidos a partir de plantas enfermas de piña a tres fungicidas, carbendazim, epoxiconazole y propiconazole a nivel *in vitro*. De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los fungicidas tienen un efecto sobre el desarrollo de *F. oxysporum*, y que podrían ser promisorios para ser evaluados, a nivel de campo, en el combate del patógeno.

7.1. Fungicida carbendazim

Para la variable de crecimiento micelial utilizando carbendazim, los aislamientos de *F. oxysporum* fueron susceptibles al fungicida, mostrando que no hay diferencias entre concentraciones utilizadas.

Para este caso, carbendazim fue altamente efectivo y retuvo su eficacia incluso en la concentración más baja, logrando un 100% de inhibición de micelio. En un estudio similar, Jiménez (2009) evaluó la eficacia de carbendazim contra *F. oxysporum*, obteniendo un 100% de inhibición en el crecimiento micelial. Este mismo porcentaje de reducción fue obtenido por Iqbal *et al.* (2010) al evaluar la aplicación de carbendazim contra *Fusarium mangiferae*. Por su parte, Albuquerque y Gusqui (2018) evaluaron la eficacia de distintos fungicidas químicos, incluido el carbendazim, para el combate *in vitro* de diferentes patógenos, dentro de los cuales se evaluó *F. oxysporum*, mostrando una inhibición del 100% en el crecimiento micelial de las colonias.

Al evaluar la germinación de esporas, el comportamiento fue diferente para cada uno de los aislamientos analizados. Un factor importante a tener en cuenta es que los diferentes aislamientos mostraron diferentes niveles de "vigor", si se comparan los porcentajes de germinación normal en los testigos que no estuvieron expuestos a los fungicidas. Con base en esto se podría ubicar el aislamiento dos como el de menor "vigor", con un porcentaje de germinación normal de 27%, los aislamientos uno y cuatro tendrían un vigor intermedio con germinaciones que oscilaron entre 49% y 58% y los que mostraron mayor vigor fueron los aislamientos tres y cinco con valores de 82% y 66% respectivamente. Sin embargo en diámetro de colonia el

comportamiento de los testigos fue diferente, en donde los aislamientos uno, dos y tres lograron cubrir el 100% del plato Petri en un menor periodo de incubación que los aislamientos cuatro y cinco.

Los aislamientos uno y dos fueron más susceptibles, mostrando bajos porcentajes de germinación normal y valores altos de esporas sin germinar. En el segundo caso esta respuesta podría estar relacionada al poco vigor del aislamiento, aunque no sería lo mismo para el primero. Alburquerque y Gusqui (2018) mencionan que el carbendazim logra inhibir la germinación de esporas y la formación del apresorio, siendo eficaz para el combate de diferentes fitopatógenos, entre los cuales se encuentra *F. oxysporum*.

En el caso de los aislamientos cuatro y cinco, estos fueron medianamente susceptibles, en donde hubo una disminución significativa de la germinación normal, un aumento considerable en el porcentaje de esporas con tubo germinativo corto, y un porcentaje bajo de esporas sin germinar, si se comparan con los aislamientos uno y dos. El alto porcentaje de conidios con tubo germinativo corto puede deberse a un efecto fungistático, donde el fungicida tiene la capacidad para inhibir la germinación de esporas o crecimiento micelial del hongo mientras permanezca en contacto continuo o por efecto residual del fungicida (Bergamo 2016), pero es difícil atribuir este efecto sin pruebas específicas. Un método para determinar este efecto es retirar la espora del producto y colocarla en un medio libre de fungicida, de manera que si continúa su crecimiento sin la presencia del producto, se comprobaría que es un efecto fungistático (González 2005).

Por último, el aislamiento tres que fue el menos susceptible al carbendazim, mostró un alto porcentaje de germinación normal al exponer las esporas al fungicida. Hay que tomar en cuenta que la pérdida de sensibilidad de un patógeno es, a menudo, repentino, debido a que estas poblaciones son poco detectables (Brent y Hollomon 2007). Por lo tanto, encontrar un aislamiento monósporico poco sensible puede ser una señal del riesgo de que se genere una resistencia severa, debido al aumento acelerado de estas poblaciones del hongo. Algo importante a tener presente es que

conforme se anotó en párrafos anteriores, este aislamiento fue el que mostró un mayor "vigor".

De acuerdo a lo anterior, se observó que los resultados de sensibilidad de las esporas al fungicida presentó, en comparación con el crecimiento micelial, más variabilidad entre aislamientos, sin embargo, esto no indica que el producto no es efectivo, sino, que se debería prestar atención a los aislamientos menos susceptibles con pruebas de sensibilidad, utilizando un mayor número de aislamientos por zona cultivada.

Según Masiello *et al.* (2019), carbendazim se ha utilizado para combatir enfermedades causadas por *Fusarium* sp. en diversas plantas, mostrando una alta capacidad para inhibir infecciones, sin embargo, se han encontrado algunas cepas resistentes a los benzimidazoles. La generación de resistencia va a depender de las circunstancias en las que el fungicida sea utilizado. Si la frecuencia de uso de un ingrediente activo a través del tiempo es alta, existe la probabilidad de que ocurra una selección de aislamientos parcial o totalmente resistentes (Klix *et al.* 2007). El uso de un mismo fungicida a una misma frecuencia de aplicación en dos distintas zonas productoras puede conducir al mismo resultado de resistencia, esto debido a que independientemente de lugar o las condiciones, la existencia de un comportamiento paralelo entre el fungicida y el patógeno es más importante (Brent y Hollomon 2007).

El aporte práctico y agronómico de este resultado es que muestra que el carbendazim inhibe el crecimiento de diámetro de la colonia y en menor proporción, la germinación de esporas. Sin embargo, al ser un estudio preliminar se necesitarían estudios más a fondo para determinar si existe algún tipo de resistencia hacia el carbendazim, en donde se utilice una mayor cantidad de aislamientos y así hacerlo más representativo.

Además, es importante considerar para la realización de estudios futuros, profundizar más sobre la dosis utilizada para carbendazim, ya que puede que la dosis comercial aplicada en campo sea más alta de la que se requiere, ya que según Jiménez (2009), es necesario conocer el punto de inflexión de las dosis en cuanto

a la respuesta de eficacia biológica y así aplicar dosis que tengan un menor impacto en la generación de resistencia en las poblaciones de *F. oxysporum* con respecto al ingrediente activo.

7.2. Fungicida epoxiconazole

Para el crecimiento micelial utilizando el fungicida epoxiconazole, se encontraron diferencias significativas tanto entre concentraciones como entre aislamientos de *F. oxysporum*. En términos generales, se observó que a menor concentración del fungicida se presentó un menor porcentaje de inhibición del crecimiento en cada uno de los diferentes aislamientos. Kopacki y Wagner (2006) probaron el fungicida difenoconazole, perteneciente al grupo de triazoles para el combate de *Fusarium avenaceum*, y determinaron que este fungicida inhibía el crecimiento lineal del micelio *in vitro*. En esta investigación el epoxiconazole presentó una buena eficacia en el crecimiento micelial, en donde a una concentración DC/10 se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores al 85%. En otros estudios *in vitro* se ha obtenido que el epoxiconazol presenta buena eficacia en el crecimiento micelial de otras especies de *Fusarium* sp. (Avozani *et al.* 2014). Klix *et al.* (2006) observaron que el epoxiconazole retrasa el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum*, pero no lo suprime por completo.

En cuanto a la variable de longitud del tubo germinativo, el cual se expresa en porcentaje de reducción, no hubo diferencias entre concentraciones del fungicida ni entre los aislamientos evaluados, siendo estos porcentajes entre 29.4% y 67.4%. En un estudio realizado por Chica *et al.* (2005) utilizaron fungicidas triazoles para el combate de *Mycosphaerella fijiensis*. Dichos autores establecieron que si el porcentaje de inhibición de crecimiento del tubo germinativo es menor a 43.7% el fungicida utilizado se considera que no es efectivo para el combate del patógeno. Este valor encontrado podría ser utilizado como referencia y junto con el presente estudio orientar a nuevas pruebas de eficacia.

Como referencia se podría utilizar los resultados superiores o cercanos a este parámetro de 43.7% como porcentajes de inhibición, esto permitiría encontrar valores con los cuales se pueda catalogar cuando el fungicida es efectivo para el

combate de *F. oxysporum* tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, contrastando los datos del estudio anterior con los obtenidos para la concentración DC/10 los aislamientos uno y tres superaron este parámetro, con 61.6% y 47.3% respectivamente y los aislamientos dos, cuatro y cinco estuvieron por debajo, con valores de 36.7%, 39.7% y 37.7% respectivamente.

Algunos autores señalan que la germinación de esporas no es suprimida en su totalidad por los inhibidores de la síntesis de ergosterol (Klix *et al.* 2006, Ramírez *et al.* 2004, Siegel 1981), esto debido a que las esporas logran germinar por la reserva de ergosterol presente en la célula del hongo, por lo que el efecto se ve directamente en el crecimiento del tubo germinal y de las hifas (Pérez 2013). Klix *et al.* (2006) mencionan que el epoxiconazole suprimió en menor grado la germinación de esporas de *F. graminearum* en comparación a otros triazoles evaluados.

7.3. Fungicida propiconazole

Para el caso de los tratamientos donde se utilizó el fungicida propiconazole, este se comportó de una manera muy similar al fungicida epoxiconazole tanto en la variable del crecimiento micelial como en la longitud del tubo germinativo. En el crecimiento micelial se observó que a menor concentración del fungicida el hongo fue menos susceptible con relación a la mayor concentración (DC). En un estudio similar Masiello *et al.* (2019), evaluaron tres concentraciones del propiconazole (2,5 – 25 – 250 pm) contra *Fusarium proliferatum*, encontrando sensibilidad en el crecimiento micelial con una inhibición de 60%, 80% y 100% en las concentraciones crecientes.

Al evaluar la longitud del tubo germinativo, el porcentaje de reducción mostró valores entre 36.9% y 63.7%. Estos resultados muestran una gran variabilidad entre concentraciones utilizadas, en donde las esporas de los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* lograron germinar en todas las concentraciones. Se menciona que el grupo de DMI presenta una mayor eficacia que otros fungicidas, pero presentan cierta variabilidad en su actividad (Masiello *et al.* 2019). Esto se puede evidenciar en este estudio, sin embargo, al utilizar un solo aislamientos de diferentes regiones del país es poco representativo para concluir que exista algún tipo de resistencia del hongo evaluado.

La información sobre la sensibilidad de *Fusarium* spp. a los fungicidas triazoles es limitada, además, tampoco está claro si entre un mismo complejo de especies difieren los niveles de sensibilidad (Machado *et al.* 2017).

La similitud entre el efecto del epoxiconazole y el propiconazole es notable tanto en el crecimiento micelial como en la longitud de tubo germinativo de las esporas de *F. oxysporum*, mostrando sensibilidad para ambos fungicidas. El comportamiento observado entre los fungicidas, sugiere una posible resistencia cruzada entre ambos, lo cual, al utilizar o alternar productos con el mismo modo de acción puede conducir a aumentar la velocidad de selección de cepas resistentes (Masiello *et al.* 2019), La resistencia cruzada comúnmente se desarrolla en compuestos que presentan el mismo modo de acción y son químicamente relacionados dentro de un mismo grupo químico, sin embargo este último aspecto no sucede con frecuencia (FAO 2012).

Comparando el efecto obtenido con el carbendazim y los dos triazoles, sería posible realizar más estudios para determinar si existe algún efecto al realizar aplicaciones alternando ambos productos, debido a que se minimiza el riesgo de una disminución en la eficacia contra *F. oxysporum*, ya que estos fungicidas pertenecen a diferentes grupos químicos con diferente modo de acción (Yossen y Conles 2014). Estudios recientes, encontraron que el uso del epoxiconazole contra *F. graminearum*, redujo la frecuencia de alelos resistentes a carbendazim, lo cual sugiere que el uso combinado de estas moléculas podría utilizarse para el combate de *Fusarium* sp. (Duan *et al.* 2018).

Tanto el micelio como los macroconidios producen las clamidosporas, las cuales son estructuras de resistencia para sobrevivir en el suelo (Dweba *et al.* 2017). Estas estructuras de resistencia conllevan a una acumulación en el suelo, que posteriormente propician a que la esporulación del hongo sea abundante, factor relevante para una mayor diseminación (Da Silva *et al.* 2015). Por lo tanto, al inhibir el crecimiento micelial se podría evitar la presencia de estas estructuras del hongo en el suelo, reduciendo a futuro la diseminación.

El inhibir el crecimiento de micelio evitaría que éste penetre directamente la raíz, tanto por aberturas naturales, pelos absorbentes o células de la epidermis (Agris 2005). Cuando el micelio penetra a través de las aberturas de las paredes celulares, ocurre una ramificación dentro de los vasos y eventualmente se da la producción de microconidios y macroconidios (Ávila 2010). Como se mencionó anteriormente, la propagación del micelio se realiza intercelularmente por la corteza de la raíz, por ende el combate del micelio es fundamental para evitar que llegue a los vasos xilemáticos. Por otro lado, si el micelio no logra producir microconidios, estos no serán transportados a la parte superior de la planta por medio de la savia, la germinación de estos no se efectuará, evitándose así la marchitez de la planta, ya que el flujo de agua y savia no se ven comprometidos (Ávila 2010).

Los tres fungicidas muestran una eficacia reducida al momento de evaluar la germinación de esporas y longitud de tubo germinativo en comparación al crecimiento micelial. Estos fungicidas presentan un mecanismo de acción con un solo sitio de acción, siendo característica potencial para el desarrollo de resistencia (FAO 2012). Sin embargo, no es posible determinar que ese sea el caso de esta investigación, debido a que la proporción de la población evaluada fue poco significativa.

Por último, las pruebas de eficacia a nivel *in vitro* solo orientan hacia dónde dirigir las próximas investigaciones y así seleccionar los fungicidas más efectivos para el combate de hongos. Por lo tanto, los resultados obtenidos *in vitro*, deben ser confirmados con pruebas en campo, en donde el fungicida interactúe con el hongo en condiciones no controladas.

8. Conclusiones

- El carbendazim fue efectivo en la inhibición del crecimiento micelial, con una inhibición del 100% en las tres concentraciones evaluadas.
- El efecto del carbendazim, sobre la inhibición de la germinación de las esporas mostró una variabilidad considerable entre los diferentes aislamientos evaluados.
- El carbendazim mostró una eficacia mayor al afectar el desarrollo del micelio, si se compara con el efecto sobre la germinación de esporas.
- El epoxiconazole y el propiconazole presentan una adecuada eficacia, siendo mayor al 60% en la inhibición del crecimiento micelial de los aislamientos evaluados, a pesar de que es menor que la obtenida con el carbendazim.
- El epoxiconazole y el propiconazole fueron menos eficientes en las concentración más baja (DC/100).
- El epoxiconazole y el propiconazole mostraron una eficacia reducida (entre 11.3% y 42%), en cuanto a la reducción en la longitud del tubo germinativo en algunos de los aislamientos, considerando como referencia un 43% de reducción obtenido por Chica *et al.* (2005).
- Los fungicidas evaluados podrían representar una buena alternativa en el combate del *F. oxysporum*, en el cultivo de piña.

9. Recomendaciones

- Extender la investigación utilizando más aislamientos provenientes de las mismas zonas y de otras zonas productoras.
- Realizar pruebas para determinar si se presenta un efecto fungicida o fungistático con los fungicidas evaluados.
- Continuar con las investigaciones del combate de estos patógenos con los fungicidas evaluados, pero en condiciones de campo.
- Realizar pruebas alternando o realizando mezclas de fungicidas con diferentes modos de acción.

10. Bibliografía

- AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.
- AJILOGBA, C. F y BABALOLA, O. O. 2013. Estrategias de manejo integradas para el marchitamiento por *Fusarium* de tomate. Biocontrol Science 18 (3): 117-127.
- ALBURQUEQUE, A. D. y GUSQUI, M. R. 2018. Effectiveness of chemical fungicides for *in vitro* control of different phytopathogens in controlled conditions. Arnaldoa 25(2): 489-498.
- ARIAS, V. S. 2016. Evaluación de la eficacia de diferentes productos biológicos sobre el desarrollo y sanidad del cultivo de piña (*Ananas comosus*), variedad MD-2, en la finca Lyl en el Sahíno, San Carlos, Alajuela, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. Tesis Lic. San Carlos, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 81 p.
- ÁVILA, M. 2010. Situación fitosanitaria y evaluación de productos alternativos y convencionales para manejar *Fusarium oxysporum* en *Vasconcella* sp. Tesis. Cuenca, EC. Universidad del Azuay. 89 p.
- AVOZANI, A., TONIN, R. B., REIS, E. M., CAMERA, J. y RANZI, C. 2014. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides. Summa Phytopathologica 40(3): 231-247.
- BÉRGAMO, A. P. V. 2016. Eficiência dos fungicidas no controle *in vitro* de fitopatógenos isolados de crotalaria. Universidade Federal De Mato Grosso, Cuiabá, Brasil. 61 p.
- BRENT, K. J. y HOLLOMON, D.W. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? FRAC Monograph 1. 2nd Ed. Brussels, CropLife International, Brussels: 55 p.

- CANAPEP. 2018. Estadísticas: Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña. San José, Costa Rica. (en línea). Disponible en: <https://canapep.com/estadisticas/>_Visitado el: 30 May 2019.
- CASTAÑEDA, P. P. 2005. Manual técnico. Seminario sobre producción y manejo poscosecha de la piña para la exportación. OIRSA (en línea). Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/sibdilibrosp/reader.action?docID=3161544> Visitado el: 21 May 2019.
- CASTRO, C. J. y UMAÑA, R. G. 2015. Poblaciones e identificación de los hongos causantes de mohos poscosecha en el pedúnculo de la piña, en dos zonas de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 39(3): 61-77.
- CERRATO, I. 2013. Estudio de mercado para la comercialización de piña MD-2. PRONAGRO. 20 p.
- CHAVES, F. L. 2018. Manejo Fitosanitario en el Cultivo de la Piña. Serie Frutales, Núm. 52. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 p (en línea). Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/frutales/manejo-fitosanitario-en-el-cultivo-de-la-pina> Visitado el: 30 May 2019.
- CHICA, E., NAVIA, D., TORRES, H. y QUILAMBAQUI, M. 2005. Efecto del butóxido de piperonilo y sus mezclas con fungicidas triazoles sobre el Crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Tecnológica ESPOL*, 18(1): 159-164.
- CORDO, C. A., TROFINO, C., STOCCO, M. C., MÓNACO, C. I., KRIPELZ, N. I. y BALATTI, P. A. 2017. Cambio en la sensibilidad al fungicida tebuconazol en las poblaciones de *Zymoseptoria tritici*, patógeno de la septoriosis de la hoja del trigo. In IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires. 14 p.
- CRIVELLI, S.C. 2017. Análisis del ciclo de vida de dos sistemas de manejo para la producción de piña en México. Tesis Msc. Barcelona, ES. Universitat Politècnica de Catalunya. 98 p.

- DA SILVA, M. E., RIBEIRO, B. F., ALCANTARA, B. L., DE OLIVEIRA, P., DOS SANTOS, L.W. y DE ARAÚJO, J. V. 2015. Producción de conidios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos. Archivos do Instituto Biológico 82: 1-5.
- DE MATOS, A.P. y MOURICHON, X. 1993. Development of resistance to infection by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in wounds of pineapple plantlets. Acta Horticulturae 334: 423–428.
- DUAN, Y., XIAO, X., LI, T., CHEN, W., WANG, J., FRAAIJE, B. A y ZHOU, M. 2018. Impact of epoxiconazole on *Fusarium* head blight control, grain yield and deoxynivalenol accumulation in wheat. Pesticide Biochemistry and Physiology 152: 138-147.
- DWEBA, C. C., FIGLAN, S., SHIMELIS, H. A., MOTAUNG, T. E., SYDENHAM, S., MWADZINGENI, L. y TSILO, T. J. 2017. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenesis and control strategies. Crop Protection 91: 114-122.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2019. FAOSTAT-Producción agrícola. (en línea) Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Visitado el: 14 Oct 2019.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2012. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas: directrices sobre la prevención y manejo de la resistencia a los plaguicidas. (en línea) Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-bt561s.pdf> Visitado el: 10 Oct 2019.
- FISHEL, F. M. y DEWDNEY, M. M. 2012. Fungicide resistance action committee's (FRAC) classification scheme of fungicides according to mode of action. PI94. University of Florida. 7 p.
- FRENCH, R. E. y HEBERT, T. T. 1980. Métodos de investigación fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, CR. 289 p.

- FRESH PLAZA. 2018. Resumen del mercado global de la pina. (en línea) Disponible en: <https://www.freshplaza.es/article/3115645/resumen-del-mercado-global-de-la-pina/>_Visitado el: 01 Jun 2019.
- GARCÍA, H. G., MARÍN, M., JARAMILLO, S. y COTES, J. M. 2008. Sensitivity to four systemic fungicides of Colombian isolates of *Phytophthora infestans*. *Agronomía Colombiana* 26(1): 47-57.
- GARCÍA, J. M. D., SHAGARODSKY, T., FRESNEDA, J. A., FUNDORA, Y. H. y GONZÁLEZ, J. 2007. Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias ciudad Habana y La Habana. *Temas de Ciencia y Tecnología* 32 (11): 63-66.
- GONZÁLEZ, A. J. 2005. Ensayos de efectividad de fungicidas *in vitro* frente a hongos de suelo. Utilidad para el conocimiento de las resistencias y el establecimiento de una pauta terapéutica adecuada. Ejemplos prácticos. España. *Phytoma España: La Revista Profesional de Sanidad Vegetal* 173: 15-19.
- HERNÁNDEZ, M. A., MUIÑO, G.B., ROSÓN, A. C., CASOLA, G. C., PORRAS, G. A. y LOPÉZ, M. A. 2010. Control químico de patógenos fúngicos en piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) de vivero (II). Cuba. *Fitosanidad* 14(4): 235-329.
- IQBAL, Z., PERVEZ, M. A., AHMAD, S., IFTIKHAR, Y., YASIN, M., NAWAZ, A., USMAN, G. M., AHMAD, D. A y SALEEM, A. 2010. Determination of minimum inhibitory concentrations of fungicides against fungus *Fusarium mangiferae*. *Pakistan Journal of Botany* 42(5): 3525-3532.
- JIMÉNEZ, V. J. 2009. Evaluación de la eficacia *in vitro* de sustancias químicas y microorganismos antagónicos del género *Trichoderma* spp., como herramienta para la toma de decisiones en el control de enfermedades "caso muerte descendente del cultivo de piña *Ananas comosus* (L) . Tesis Lic. San Carlos, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 70 p.

- KHAN, M. R. y KHAN, S. M. 2002 Effects of root- dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresource Technol* 85: 213-215.
- KIMARU, S. K., MONDA, E., CHERUIYOT, R. C., MBAKA, J., y ALAKONYA, A. 2018. Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from diseased avocado fruits to selected fungicides in Kenya. *Advances in Agriculture*, 2018: 6 p.
- KLIX, M. B., VERREET, J. A. y BEYER, M. 2007. Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zea* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection* 26(4): 683-690.
- KOPACKI, M. y WAGNER, A. 2006. Effect of some fungicides on mycelium growth of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. pathogenic to chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Agronomy Research* 4: 237-240.
- LESLIE, J. F. Y SUMMERELL, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Iowa, USA, 388 p.
- MACHADO, F. J., NICOLLI, C. P., MÖLLER, P. A., ARRUDA, R., WARD, T. J. y DEL PONTE, E. M. 2017. Differential triazole sensitivity among members of the *Fusarium graminearum* species complex infecting barley grains in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 42(3): 197-202.
- MANSILLA, H. A., MUIÑO, G. B., ROSÓN, A. C., CASOLA, C., PORRAS, G. A. y LÓPEZ, M. A. 2010. Control químico de patógenos fúngicos en piña (*Ananas comosus* (L.) Merrill) de vivero (II). Cuba. *Fitosanidad* 14(4): 235-239.
- MARÍN, P. y BUSTILLO, A. E. 2002. Pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para el control de calidad de los hongos entomopatógenos. *Memorias Curso Internacional Teórico-Práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos naturales de la broca del café*. Colombia. *Cenicafé* 72-89.
- MASIELLO, M., SOMMA, S., GHIONNA, V., LOGRIECO, A. y MORETTI, A. 2019. *In vitro* and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus*

- and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins* 11(1): 11.
- MONTESINOS, S. E. 2005. La resistencia a fungicidas y bactericidas, Factores de riesgo asociados al mecanismo de acción y al potencial evolutivo del patógeno. España. *Phytoma España: La Revista Profesional De Sanidad Vegetal* (173): 10-15.
- MONTIEL, M. A. 2015. Uso de agroquímicos en la producción intensiva de piña en Costa Rica. *Revista Pensamiento Actual, UCR* 15 (25): 183-195.
- MONZÓN, A. y RODRÍGUEZ, T. J. L. 1997. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 6. (en línea) Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf> Visitado el: 30 May 2019
- MORTON, V. y STAUB, T. 2008. A short history of fungicides. *APSnet Features* 12 p.
- MURILLO, M. R. 2007. Guía de identificación y manejo integrado de plagas y enfermedades en piña. *REP-Car BANACOL Colaboradores*, 60 p.
- NEL, B., STEINBERG, C., LABUSCHAGNE, N. y VILJOE, A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot* 26: 697-705.
- NOVAES, S., DE RESENDE, M. y PAIVA, P. 2005. Efeito de diferentes fungicidas e de resistencia na inibicao do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.p. *gladioli* e comparacao de metodologias de inoculacao em bulbos. *Summa Phytopatológica* 31(4): 371-373.
- OSORIO, G. L., CASTAÑO, Z.J. y GUTIÉRREZ, R.L. 2012. Eficacia *in-vitro* de lixiviados de plátano sobre *Fusarium oxysporum* schlecht, causante de la pudrición de raíces de arveja (*Pisum sativum* Linneo). *Agronomía* 20(1): 17-25.
- PÉREZ, V. L. 2013. Manual on fungicides and fungicide resistance monitoring in

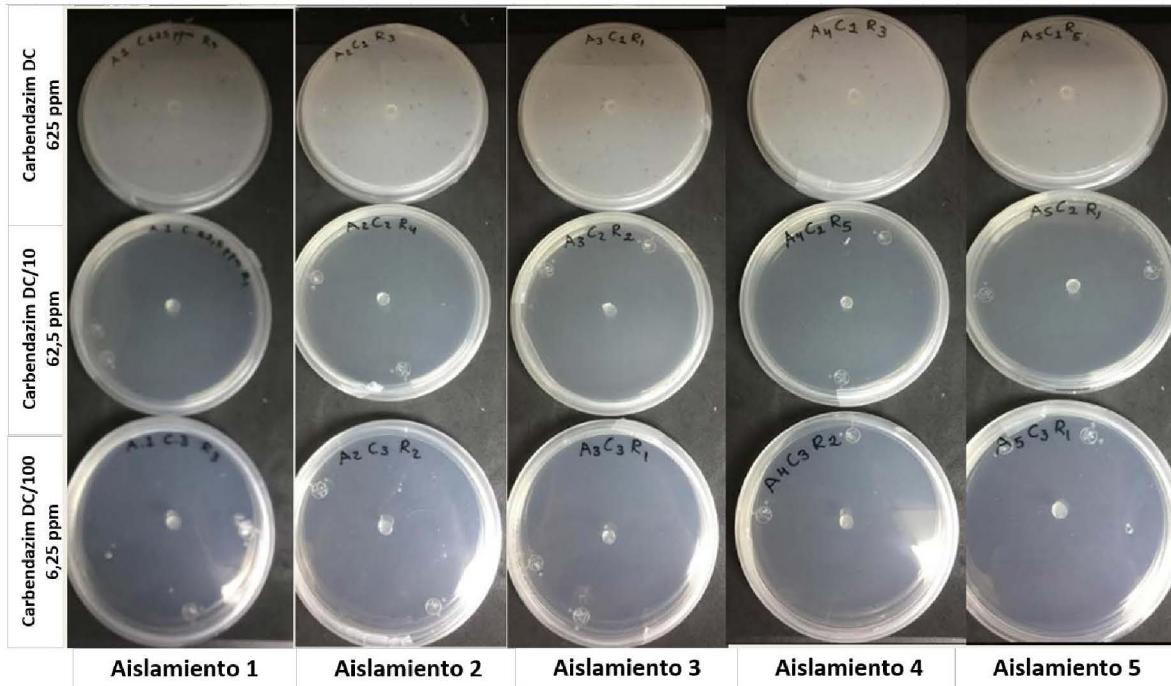
banana. FAO. 69 p.

- PINZÓN, M. I., LONDOÑO, A., BLACH, D., GUTIÉRREZ, J. A. y ROJAS, A. M. 2011. Determinación de residuos de plaguicidas organoclorados POR gc-uECD en frutos de piña (*Ananas comosus L.*) variedad Golden MD2 en el departamento del Quindío. Colombia. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 9(2): 4-8.
- PISSARRA, T.B., CHAVES, G.M. y VENTURA, J.A. 1979. Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. & Reink.) do abacaxizeiro. Fitopatologia Brasileira 4: 255-263.
- PLOETZ, R. C. 2006. *Fusarium* induced diseases of tropical, perennial crops. Phytopathology 96(6): 648–652.
- RAMIREZ, M.L., CHULZE, S. y MAGAN, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. Crop Prot 23: 117-125.
- RETANA, K., RAMÍREZ-COCHÉ, J. A., CASTRO, O. y BLANCO-MENESES, M. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía Costarricense 42(1): 115-126.
- RIVERO, D., CRUZ, A., MARTÍNEZ, B., RAMÍREZ, M. A., RODRÍGUEZ, A. T. y CÁRDENAS, R. M. 2004. Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* sp. Revista de Protección Vegetal 19(2): 140-144.
- ROHRBACH, K. G. y SCHMITT. D. 2003. Diseases of pineapple. In Ploetz, R.C. (eds) Diseases On Tropical Fruit Crops. Florida, USA. IFAS. 443-464 p.
- RUBIO, R. G., BALDODANO, S. F., ABANTO, C. L., WILSON, K. J. y MUÑOZ, R. M. 2008. Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. Revista Biológica de la Universidad de Trujillo, Perú 28(2): 34-46.

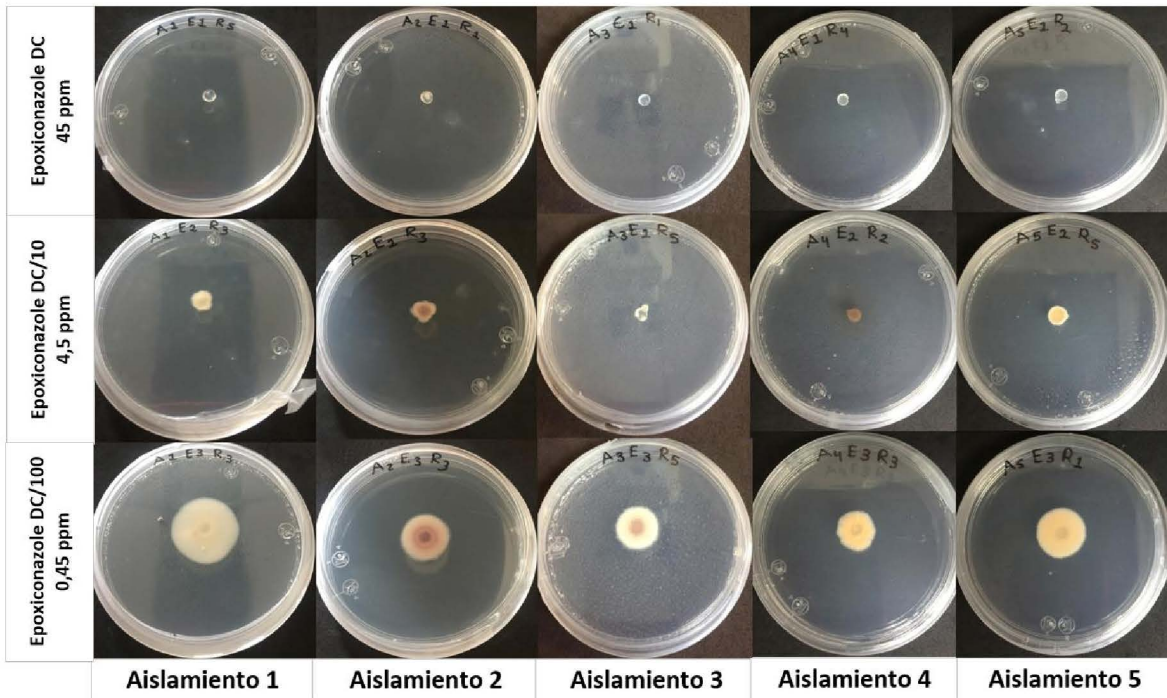
- RUSSELL, P. E. 2002. Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. FRAC Monograph 3, 56 p.
- SÁNCHEZ, E. J. A. 2012. Manual para la producción de una piña de calidad. 41 p. (en línea) Disponible en: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia_plantas/f01-cultivo/2018/manual_produccion_pia.pdf Visitado el: 10 May 2019
- SECOR, G. A. y RIVERA, V. V. 2012. Fungicide resistance assays for fungal plant pathogens. Humana Press. In Plant Fungal Pathogens 385-392.
- SFE. (2019). Insumos y Fiscalización, Servicio Fitosanitario del Estado, MAG, Costa Rica (en línea) Disponible en: <http://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Seguridad/Home.aspx> Visitado el: 30 May 2019
- SIEGEL, M.R., 1981. Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterol biosynthesis and sites of action. Plant Dis 65: 986-989.
- SINGLETON, P. y SAINSBURY, D. 2006. Fusarium, Diccionario de microbiología y biología molecular (3ª ed.). Hoboken, NJ: Wiley. (en línea) Disponible en: <http://ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/login?qurl=https%3A%2F%2Fsearch.credo-reference.com%2Fcontent%2Fentry%2Fwileymicrob%2Ffusarium%2F0%3FinstitutionId%3D7919> Visitado el: 30 May 2019
- SOLANO, J. 2015. Efecto del tiempo transcurrido entre cosecha e inicio de enfriamiento en túneles de aire forzado, sobre la vida útil de almacenamiento de piña (*Ananas comosus*) var. Dorada Extra Dulce, en dos zonas de Costa Rica. Tesis Lic. San José, CR. Universidad de Costa Rica. 29 p.
- UMAÑA, C. J. 2018. Relaciones genéticas y características fisiológicas de especies promisorias de *Trichoderma* como agentes biocontroladores de *Fusarium oxysporum* y *Pectobacterium carotovorum*, patógenos de la piña (*Ananas comosus*). Tesis Lic. Heredia, CR. Universidad Nacional. 65 p.

- VELÁSQUEZ, F.D. 2018. Efecto de la irradiación de luz ultravioleta uv-c sobre el desarrollo de moho y otras variables de calidad poscosecha en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) Híbrido MD-2. Tesis Lic. San José, CR. Universidad de Costa Rica. 121 p.
- VILLA, M. A., PÉREZ, L. R., MORALES, M. H. A., BASURTO, S. M., SOTO, P. J. M. y MARTÍNEZ, E. E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica* 64(2): 194-205.
- VILLEGAS, O., VARGAS, F., PÉREZ, J. A., GARCÍA, R., PORRAS, S., MENESES, D., QUESADA, A., DELGADO, G., ALPIZAR, D., MORA, B., LEÓN, R. y ALFARO, D. 2007. Caracterización y plan de acción para el desarrollo de la agrocadena de piña en la región Huetar Norte. Ciudad Quesada, CR. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 63 p.
- YOSSEN, V. E. y CONLES, M. Y. 2014. Eficacia de fungicidas *in vitro* para el control de *Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 91(1): 19-25.

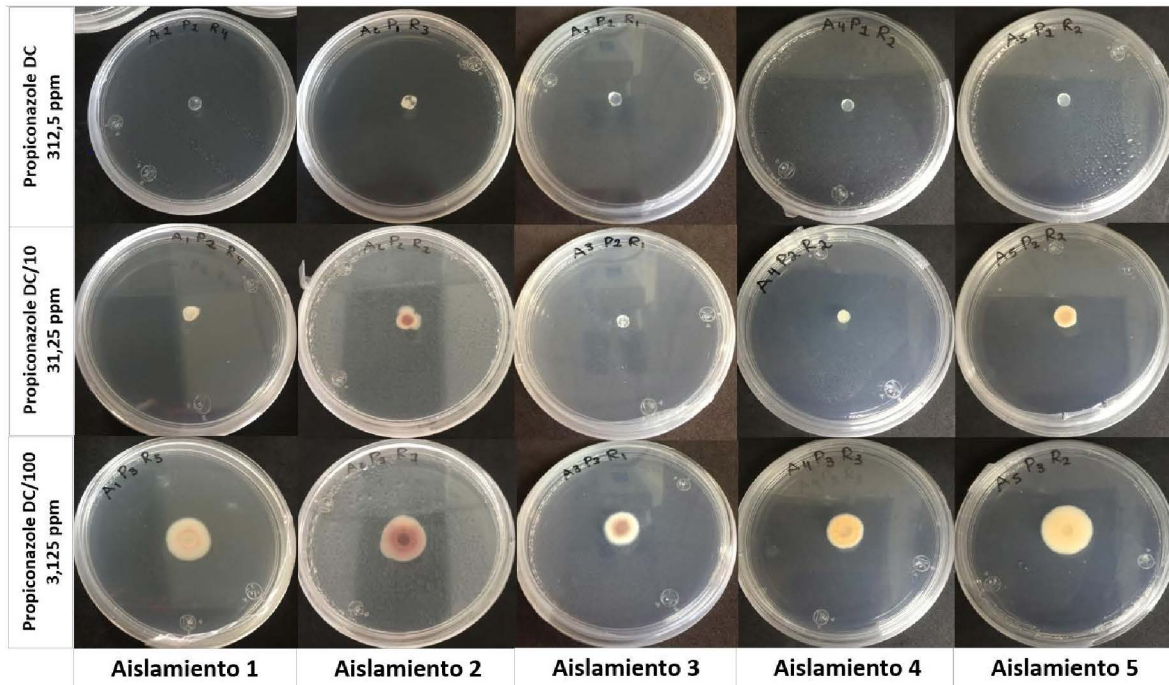
11. Anexos



Anexo 1. Inhibición de crecimiento micelial de los cinco aislamientos de *F. oxysporum* "in vitro", en medio de cultivo enmendado a diferentes concentraciones con el fungicida carbendazim; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 625 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 62,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 6,25 ppm.



Anexo 2. Inhibición de crecimiento micelial de los cinco aislamientos de *F. oxysporum* “*in vitro*”, en medio de cultivo enmendado a diferentes concentraciones con el fungicida epoxiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 625 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 62,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 6,25 ppm.



Anexo 3. Inhibición de crecimiento micelial de los cinco aislamientos de *F. oxysporum* “*in vitro*”, en medio de cultivo enmendado a diferentes concentraciones con el fungicida propiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019. DC: Dosis comercial 625 ppm, DC/10: Décima parte dosis comercial 62,5 ppm, DC/100 centésima parte dosis comercial 6,25 ppm.

Análisis de la varianza

Fungicida	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Epoxiconazole	% Reducción	75	0,98	0,98	2,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14354,67	14	1025,33	231,28	<0,0001
Dosis	12758,59	2	6379,29	1438,94	<0,0001
Aislamiento	685,47	4	171,37	38,65	<0,0001
Dosis*Aislamiento	910,61	8	113,83	25,68	<0,0001
Error	266,00	60	4,43		
Total	14620,67	74			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=2,8447

Error: 4,4333 gl: 60

Dosis	Aislamiento	Medias	n	E.E.					
3	1	63,60	5	0,94	A				
3	3	64,60	5	0,94	A				
3	2	69,20	5	0,94		B			
3	5	71,20	5	0,94		B			
3	4	78,80	5	0,94			C		
2	2	85,00	5	0,94				D	
2	5	89,80	5	0,94					E
2	1	90,40	5	0,94					E
2	3	99,40	5	0,94					F
1	3	100,00	5	0,94					F
1	2	100,00	5	0,94					F
1	1	100,00	5	0,94					F
2	4	100,00	5	0,94					F
1	5	100,00	5	0,94					F
1	4	100,00	5	0,94					F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 4. Análisis estadístico del porcentaje de reducción del crecimiento micelial de *F. oxysporum* “*in vitro*” en medio de cultivo enmendado con el fungicida epoxiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Fungicida	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Propiconazole	% Reducción	75	0,97	0,96	2,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10836,35	14	774,02	146,41	<0,0001
Dosis	9775,39	2	4887,69	924,53	<0,0001
Aislamiento	544,08	4	136,02	25,73	<0,0001
Dosis*Aislamiento	516,88	8	64,61	12,22	<0,0001
Error	317,20	60	5,29		
Total	11153,55	74			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=3,1064

Error: 5,2867 gl: 60

Dosis	Aislamiento	Medias	n	E.E.				
3	5	69,00	5	1,03	A			
3	3	71,60	5	1,03		B		
3	1	72,20	5	1,03		B		
3	2	73,20	5	1,03		B		
3	4	79,20	5	1,03			C	
2	2	85,40	5	1,03				D
2	5	88,00	5	1,03				D
2	1	95,00	5	1,03				E
2	3	97,40	5	1,03				E
1	2	99,60	5	1,03				
1	1	100,00	5	1,03				F
1	3	100,00	5	1,03				F
2	4	100,00	5	1,03				F
1	5	100,00	5	1,03				F
1	4	100,00	5	1,03				F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5. Análisis estadístico del porcentaje de reducción del crecimiento micelial de *F. oxysporum* “*in vitro*” en medio de cultivo enmendado con el fungicida propiconazole; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Aislamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
1	Porcentaje	60	0,93	0,92	25,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	50024,53	11	4547,68	60,83	<0,0001
Germinación	29379,73	2	14689,87	196,48	<0,0001
Dosis	2,7E-12	3	0,00	0,00	>0,9999
Germinación*Dosis	20644,80	6	3440,80	46,02	<0,0001
Error	3588,80	48	74,77		
Total	53613,33	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=11,6666

Error: 74,7667 gl: 48

Germinación	Dosis	Medias	n	E.E.		
Normal	2	0,00	5	3,87	A	
Normal	1	0,00	5	3,87	A	
Normal	3	1,20	5	3,87	A	
Tubo corto	2	18,00	5	3,87	B	
No germinado	4	22,80	5	3,87	B	
Tubo corto	3	23,20	5	3,87	B	
Tubo corto	1	24,40	5	3,87	B	
Tubo corto	4	28,00	5	3,87	B	
Normal	4	49,20	5	3,87		C
No germinado	1	75,60	5	3,87		D
No germinado	3	75,60	5	3,87		D
No germinado	2	82,00	5	3,87		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 6. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de *F. oxysporum*, por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento uno, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Aislamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2	Porcentaje	60	0,99	0,98	15,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	89680,53	11	8152,78	295,39	<0,0001
Germinación	80410,53	2	40205,27	1456,71	<0,0001
Dosis	0,00	3	-3,6E-12	0,00	>0,9999
Germinación*Dosis	9270,00	6	1545,00	55,98	<0,0001
Error	1324,80	48	27,60		
Total	91005,33	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=7,0883

Error: 27,6000 gl: 48

Germinación	Dosis	Medias	n	E.E.				
Normal	1	0,00	5	2,35	A			
Normal	2	0,00	5	2,35	A			
Normal	3	0,00	5	2,35	A			
Tubo corto	1	2,00	5	2,35	A			
Tubo corto	3	6,40	5	2,35	A			
Tubo corto	2	6,80	5	2,35	A			
Tubo corto	4	17,20	5	2,35		B		
Normal	4	27,20	5	2,35			C	
No germinado	4	55,60	5	2,35			D	
No germinado	2	93,20	5	2,35				E
No germinado	3	93,60	5	2,35				E
No germinado	1	98,00	5	2,35				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de *F. oxysporum*, por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento dos, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Aislamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
3	Porcentaje	60	0,90	0,88	26,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	35162,13	11	3196,56	40,51	<0,0001
Germinación	21736,93	2	10868,47	137,75	<0,0001
Dosis	0,00	3	-1,4E-12	0,00	>0,9999
Germinación*Dosis	13425,20	6	2237,53	28,36	<0,0001
Error	3787,20	48	78,90		
Total	38949,33	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=11,9847

Error: 78,9000 gl: 48

Germinación	Dosis	Medias	n	E.E.	
No germinado	2	5,20	5	3,97	A
No germinado	1	7,20	5	3,97	A
No germinado	3	8,00	5	3,97	A
Tubo corto	4	8,40	5	3,97	A
No germinado	4	9,60	5	3,97	A
Normal	3	35,60	5	3,97	B
Normal	1	41,60	5	3,97	B
Tubo corto	2	42,80	5	3,97	B
Tubo corto	1	51,20	5	3,97	C
Normal	2	52,00	5	3,97	C
Tubo corto	3	56,40	5	3,97	C
Normal	4	82,00	5	3,97	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 8. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de *F. oxysporum*, por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento tres, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Aislamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	Porcentaje	60	0,80	0,75	38,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31458,13	11	2859,83	16,97	<0,0001
Germinación	14936,13	2	7468,07	44,30	<0,0001
Dosis	0,00	3	0,00	0,00	>0,9999
Germinación*Dosis	16522,00	6	2753,67	16,34	<0,0001
Error	8091,20	48	168,57		
Total	39549,33	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=17,5177

Error: 168,5667 gl: 48

Germinación	Dosis	Medias	n	E.E.	
Normal	3	1,60	5	5,81	A
Normal	1	5,20	5	5,81	A
Normal	2	8,00	5	5,81	A
No germinado	4	8,80	5	5,81	A
No germinado	2	26,80	5	5,81	B
No germinado	1	31,60	5	5,81	B
Tubo corto	4	33,20	5	5,81	B
No germinado	3	39,60	5	5,81	B
Normal	4	58,00	5	5,81	C
Tubo corto	3	58,80	5	5,81	C
Tubo corto	1	63,20	5	5,81	C
Tubo corto	2	65,20	5	5,81	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 9. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de *F. oxysporum*, por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento cuatro, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Aislamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
5	Porcentaje	60	0,93	0,92	26,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	50803,73	11	4618,52	61,15	<0,0001
Germinación	28992,13	2	14496,07	191,92	<0,0001
Dosis	0,00	3	0,00	0,00	>0,9999
Germinación*Dosis	21811,60	6	3635,27	48,13	<0,0001
Error	3625,60	48	75,53		
Total	54429,33	59			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=11,7263

Error: 75,5333 gl: 48

Germinación	Dosis	Medias	n	E.E.		
No germinado	4	0,80	5	3,89	A	
Normal	2	2,80	5	3,89	A	
Normal	1	4,80	5	3,89	A	
Normal	3	10,40	5	3,89	A	
No germinado	3	17,60	5	3,89		B
No germinado	1	18,40	5	3,89		B
No germinado	2	22,00	5	3,89		B
Tubo corto	4	32,80	5	3,89		C
Normal	4	66,40	5	3,89		D
Tubo corto	3	72,00	5	3,89		D
Tubo corto	2	75,20	5	3,89		D
Tubo corto	1	76,80	5	3,89		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 10. Análisis estadístico del porcentaje de conidios de *F. oxysporum*, por categoría (germinación normal, tubo germinativo corto y no germinados) del aislamiento cinco, al exponerlo a tres concentraciones del fungicida carbendazim, a nivel "in vitro"; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% inhibición	75	0,29	0,13	36,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6630,92	14	473,64	1,77	0,0648
Aislamiento	1682,32	4	420,58	1,57	0,1932
Dosis	1525,69	2	762,85	2,85	0,0655
Aislamiento*Dosis	3422,91	8	427,86	1,60	0,1440
Error	16044,22	60	267,40		
Total	22675,14	74			

Test:DGC Alfa=0,05 PCALT=22,0927

Error: 267,4036 gl: 60

Aislamiento	Dosis	Medias	n	E.E.
3	3	29,43	5	7,31 A
2	2	36,71	5	7,31 A
5	2	37,72	5	7,31 A
2	3	38,55	5	7,31 A
4	1	38,76	5	7,31 A
4	2	39,73	5	7,31 A
4	3	40,51	5	7,31 A
5	3	44,19	5	7,31 A
1	3	45,28	5	7,31 A
2	1	47,29	5	7,31 A
3	2	47,32	5	7,31 A
5	1	49,20	5	7,31 A
1	1	50,53	5	7,31 A
1	2	61,56	5	7,31 A
3	1	67,35	5	7,31 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 11. Análisis estadístico del porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de *F. oxysporum* expuestos a diferentes concentraciones del fungicida epoxiconazole a nivel “*in vitro*”; San Pedro, Costa Rica, 2019.

Modelos lineales generales y mixtos

Variable dependiente: Porcentaje de inhibición

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
75	544,24	577,74	-256,12	14,13	0,51	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	822,68	<0,0001
Aislamiento	4	7,90	<0,0001
Dosis	2	1,84	0,1682
Aislamiento:Dosis	8	3,34	0,0032

Porcentaje de inhibición - Medias ajustadas y errores estándares para Aislamiento*Dosis

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Aislamiento	Dosis	Medias	E.E.	
3	1	63,72	6,32	A
2	1	59,75	6,32	A
1	2	57,85	6,32	A
5	2	56,94	6,32	A
3	2	56,55	6,32	A
1	1	55,90	6,32	A
1	3	53,10	6,32	A
5	1	48,16	6,32	A
2	3	42,60	6,32	A
2	2	41,65	6,32	A
3	3	40,22	6,32	A
4	3	40,08	6,32	A
4	2	37,32	6,32	A
5	3	36,94	6,32	A
4	1	11,34	6,32	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 12. Análisis estadístico del porcentaje de reducción en la longitud del tubo germinativo de esporas de diferentes aislamientos de *F. oxysporum* expuestos a diferentes concentraciones del fungicida propiconazole a nivel “*in vitro*”; San Pedro, Costa Rica, 2019.