

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS  
ESCUELA DE AGRONOMIA**

**Evaluación de la eficacia de seis moléculas químicas y dos biológicas para el manejo de la pudrición basal (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) bajo condiciones de invernadero.**

**Por:**

**Grettel Núñez Solano  
Turrialba, Costa Rica, 2016**

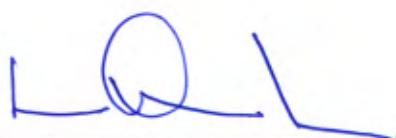
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la Universidad de Costa Rica y aprobada por el Comité consejero del postulante como requisito parcial para optar por el grado de:  
Licenciatura Agronómica con Énfasis en Fitotecnia

**Firmantes:**



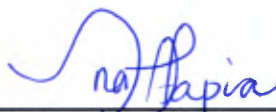
---

**Dr. Alex Murillo Fernández**  
Director



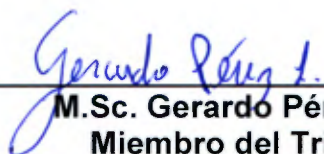
---

**M.Sc. Eric Josafat Quesada Díaz**  
Director de Tesis



---

**M.Sc. Ana Tapia Fernández**  
Codirectora de Tesis



---

**M.Sc. Gerardo Pérez León**  
Miembro del Tribunal



---

**Lic. Juan Manuel Ureña Morales**  
Miembro del Tribunal



---

**Grettel Núñez Solano**  
Postulante

**DEDICATORIA**

**A Dios y La Virgen María  
A mis papás Lucrecia y Eladio  
A mis hermanos Alejandro y Warner  
A todos los que me dieron su apoyo**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios y a la Virgen por permitirme realizar este proyecto, a mis papás y hermanos por la paciencia y el apoyo, al resto de mi familia que de una u otra forma han formado parte de esto.

A M.Sc. Eric Josafat Quesada Díaz, Msc. Ana Tapia Fernández, M.Sc. Gerardo Pérez León, Lic. Juan Manuel Ureña Morales, por el apoyo técnico en la realización de esta tesis.

A Jorge Álvarez, Juan José Pereira y todo el personal del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica Sede del Atlántico, por su valiosa ayuda en cuanto al procesamiento de las muestras.

A la empresa Coseinca S.A. por darme su apoyo y ayuda en cada una de las etapas de este proyecto. A todos mis compañeros y amigos y todos los agricultores que me brindaron sus conocimientos.

A Maikol, por ser mí guía durante tanto tiempo.

A Cristian y todas las personas de distintas empresas que me brindaron su ayuda.

A mis compañeros y amigos de vida universitaria, gracias.

## CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	IV
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	2
<b>JUSTIFICACION</b> .....	3
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	4
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	4
<b>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b> .....	4
<b>Generalidades del Cultivo</b> .....	4
<b>Principales enfermedades de la cebolla</b> .....	5
<i><b>Fusarium oxysporum</b></i> .....	6
<b>Agente causal</b> .....	6
<b>Sintomatología</b> .....	6
<b>Medidas de manejo para la pudrición basal</b> .....	7
<b>Combate cultural</b> .....	7
<b>Combate biológico</b> .....	8
<b>Combate químico</b> .....	8
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
<b>Primera etapa</b> .....	9
<b><i>Evaluación de la actividad fungicida de los productos seleccionados ante F. oxysporum en condiciones in vitro</i></b> .....	9
<b>Ubicación</b> .....	9
<b>Obtención de cultivos</b> .....	9
<b>Tratamientos</b> .....	10
<b>Evaluación de la eficacia <i>in vitro</i></b> .....	13
<b>Selección de los tratamientos evaluados para la segunda etapa (<i>in vivo</i>)</b> .....	13
<b>Segunda etapa</b> .....	14



<b><i>Evaluación de la eficacia de los productos seleccionados en plántulas de cebolla</i></b> .....	14
<b>Ubicación</b> .....	14
<b>Establecimiento del material vegetal</b> .....	14
<b>Inoculación de la cepa de <i>Fusarium oxysporum</i></b> .....	15
<b><i>Preparación del inóculo de Fusarium oxysporum</i></b> .....	15
<b><i>Inoculación de las plantas con Fusarium oxysporum</i></b> .....	15
<b>Aplicación de los productos seleccionados</b> .....	16
<b>Variables fitopatológicas</b> .....	16
<b>Variables fisiológicas y de crecimiento</b> .....	17
<b>Diseño experimental y análisis estadístico</b> .....	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	19
<b>Primera etapa</b> .....	20
<b><i>Evaluación de los productos in vitro</i></b> .....	20
<b>Segunda etapa</b> .....	23
<b><i>Evaluación de la eficacia de los productos seleccionados en plántulas de cebolla</i></b> .....	23
<b>CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	31
<b>SUGERENCIAS AGRONOMICAS</b> .....	32
<b>REFERENCIAS</b> .....	33
<b>ANEXOS</b> .....	37

## RESUMEN

La investigación se realizó en dos etapas, una de laboratorio y otra de invernadero, la evaluación de la eficacia *in vitro* de los fungicidas para la inhibición del patógeno *Fusarium oxysporum* se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico y la segunda etapa se realizó bajo un sistema controlado de invernadero en las instalaciones de la empresa Almacigos Pacayas, ubicada en Tierra Blanca de Cartago.

En la primera etapa se realizó pruebas de sensibilidad del patógeno *Fusarium oxysporum* a distintos productos comerciales, tanto químicos como biológicos, con el propósito de determinar el EC<sub>50</sub> y con base en los mejores resultados, se realizó la prueba a nivel de invernadero. En la segunda etapa se realizó dos aplicaciones de los productos seleccionados a plantas de cebolla inoculadas con el patógeno en estudio, las cuales se encontraban sembradas en bandejas plásticas.

Las variables biológicas en planta evaluadas fueron grosor del tallo (mm), biomasa (g), altura de planta (cm), longitud radical (cm) y volumen radical (cm<sup>3</sup>), estas dos últimas evaluadas con el Winrizo. Además se determinó la presencia o ausencia del patógeno en el sustrato al final del ciclo de desarrollo de las plantas en invernadero.

El análisis estadístico mostró que ninguno de los tratamientos evaluados mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables evaluadas, sin embargo se logró determinar que los tratamientos con Procloraz, Fludioxinil y Metconazole; son alternativas importantes por considerar dentro del paquete de manejo agronómico del cultivo de cebolla, ya que controlan el patógeno *Fusarium*, además son moléculas con distintas caracterizaciones de código Frac.



## INTRODUCCION

La cebolla (*Allium cepa* L.) es un cultivo que se produce en Costa Rica la mayor parte del año. En la zona alta de Cartago, se cultiva aproximadamente el 70% de la producción nacional, mientras que en la zona media y baja se da una producción al año dadas las condiciones ambientales y requerimientos de cada variedad. De la cosecha de este bulbo se encargan principalmente pequeños y medianos productores conocedores de la actividad (Jaén y Azofeifa 2010).

Según Salazar (2003), las zonas de siembra más importantes en Costa Rica en la zona alta de Cartago son: Cot, Potrero Cerrado, Tierra Blanca y Llano Grande; para la zona baja Santa Ana, San Antonio de Escazú en San José, San Antonio de Belén en Heredia y San Rafael, la Guácima de Alajuela; demás en Guanacaste se cultiva en el cantón de Bagaces. Datos del SEPSA (2011) indican que para el 2010 la producción de cebolla fue de 34.940 toneladas métricas, Jaén y Azofeifa (2010) agregan que en la actividad participan 592 agricultores cebolleros, lo cual demuestra que es un cultivo de relevancia económica manejado por agricultores con extensiones de terreno mesurados.

La producción se realiza en dos épocas de siembra denominadas: veranera (de enero a mayo) e inverniz (de mayo a diciembre). En la zona alta de Cartago generalmente se cultiva como inverniz y la producida en las otras zonas como veranera. Sin embargo, por las condiciones climáticas en Cartago se hace posible que se realicen dos siembras al año (Granados 2004). Estas condiciones productivas hacen que las plantaciones sean propensas al ataque de enfermedades, que dañan tanto el área foliar, radical y el bulbo de las plantaciones de cebolla.

Varios patógenos son capaces de infectar el sistema radical de la cebolla los principales son los hongos *Pyrenochaeta terrestris*, *Sclerotinia* sp, *Sclerotium cepivorum*, entre otros. Sin embargo, de las enfermedades más limitantes para el cultivo de la cebolla, la pudrición basal producida por el hongo *Fusarium oxysporum* en su forma especializada, es la enfermedad más frecuente, afecta todos los estadios fenológicos de las plantas, particularmente en estadio de



plántulas causa su muerte al atacar el sistema radical, por las lesiones en las raíces el hongo penetra hasta infectar la base, donde ocasiona necrosis del sistema vascular, que degenera en un amarillamiento del área foliar y hasta la muerte de la planta (Apaza y Mattos 2002)

## **JUSTIFICACION**

La zona alta de Cartago se caracteriza por su dedicación agrícola, es frecuente observar campos de cultivo de papa, zanahoria, brassicas, cebolla entre otras hortalizas. En particular la cebolla es uno de los principales cultivos en el distrito de Tierra Blanca, zona cebollera por excelencia que ha reportado infecciones considerables por *Fusarium oxysporum* en años recientes (Serrano y Mora 2007), además el cultivo de la cebolla ha iniciado con buenas expectativas para la zona de Pacayas; donde se cultiva generalmente en época seca, ambas zonas utilizan distintas variedades entre ellas E515, Gladalan Brown y Alvara; esta última recientemente ingresada a la zona alta de Cartago, ha presentado, de acuerdo con los productores del cultivo, muy buenos resultados en cuanto a producción y rendimiento. Sin embargo ninguna de las variedades anteriores reporta resistencia o tolerancia a los patógenos naturales de suelo.

El uso excesivo de los suelos y la continua siembra de un mismo cultivo (carencia de sistemas de rotación de cultivos), son dos de los factores que han contribuido a que los microorganismos edáficos fitopatógenos de los cultivos en general, aumenten y se establezcan en estos suelos, esto representa un grave problema en cuanto a su manejo ya que no sólo disminuye los rendimientos esperados sino que también aumenta los costos por el uso adicional de insumos, además compromete la salud del sistema con el empleo de alternativas que no solucionan el problema pero que lo pueden llegar a empeorar por el uso indebido de algunas moléculas, en particular químicas, dirigidas al suelo (FAO 2006). La utilización de productos químicos para la desinfección del suelo antes de la siembra, como aplicaciones postemergentes a la planta durante el ciclo vegetativo, han sido las formas en que actualmente los agricultores han tratado el problema de pudrición basal.

De esta forma esta investigación buscó aclarar si los productos de síntesis química que se utilizan actualmente, resultan efectivos para el manejo de pudrición basal (*Fusarium oxysporum*) y a su vez evaluar si es posible que se estén presentando procesos de pérdida de sensibilidad a productos o moléculas de síntesis químicas por parte del patógeno que ha sido expuesto a frecuentes aplicaciones de varias de estas moléculas en las últimas décadas. Se busca además aumentar las opciones de control con alternativas de manejo con productos orgánicos y otros químicos, con las que pueden contar los productores de cebolla en Cartago.

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la eficacia de seis moléculas químicas y dos productos biológicos contra *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición basal en plantaciones de cebolla bajo condiciones controladas.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar el efecto fungicida de los productos comerciales seleccionados mediante la evaluación de presencia o ausencia del patógeno al final del ciclo en etapa de invernadero.
2. Evaluar el efecto de los productos comerciales seleccionados sobre el desarrollo fisiológico de la planta de cebolla mediante variables de crecimiento y desarrollo del cultivo.

### **REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

#### **Generalidades del Cultivo**

Granados (2004), menciona que la cebolla pertenece a la familia Liliaceae, es originaria de Asia Central y formaba parte de la dieta de los Egipcios desde



3200 años a.c. Se utiliza principalmente como condimento, aunque tiene propiedades medicinales, entre las más importantes se citan las diuréticas, pectorales, circulatorias, antiinflamatorias, laxantes y sedantes; además mencionan su función en el tratamiento para la varicela y la gripe.

De acuerdo con estadísticas del Ministerio de Agricultura y Ganadería (2007), este cultivo ocupa uno de los primeros lugares de consumo entre las hortalizas en Costa Rica. Se utiliza principalmente en estado fresco, como condimento y en ensaladas. Además la cebolla deshidratada se utiliza para ser usada como base en la elaboración de diferentes productos, así como ingrediente en la elaboración de vegetales mixtos, encurtidos y en vinagre.

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (1991) y Lardizabal (2007), la temperatura óptima para el desarrollo del cultivo es alrededor de los 13°C y 14°C con máxima de 30°C y mínima de 7°C, se desarrolla adecuadamente a una altura de 500 a 1,800 metros sobre el nivel del mar, se siembra tanto en suelos arcillosos como en los francos con buen drenaje, ya que no tolera excesos de agua; se produce en zonas con una precipitación que va entre los 500 y 1,200 mm/año, el pH óptimo del suelo donde se cultiva debe estar entre 6 y 6,5 y no tolera suelos ácidos, puede cultivarse todo el año siempre que se utilice las variedades que se adapta a cada mes, pues este cultivo es afectado fuertemente por el foto período.

### **Principales enfermedades de la cebolla**

La cebolla puede ser infectada por microorganismos patogénicos que pueden presentarse durante parte de su ciclo del cultivo o bien ser susceptibles en todo su desarrollo, entre las enfermedades foliares, *Alternaria porri*, *Botrytis* sp, *Peronospora destructor*, *Stemphyllium* sp (Koike y colaboradores 2007, Vadeagro 2006 y Bejo 2011).

Los principales problemas causantes de las pudriciones en la raíz son los hongos *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium* y *Pythium* spp. (Vincelli y Lorbeer 1990, McDonald 1994; Montes-Belmont et al., 2003).

## ***Fusarium oxysporum***

### ***Agente causal***

*F. oxysporum*, comúnmente conocido como pudrición roja, es un hongo saprofito habitante de suelo que puede ocasionar epífitias en el cultivo de cebolla y sobrevivir en el suelo durante algunos años por medio de estructuras como conidios, micelio y clamidiosporas (Bejo 2011), con una amplia gama de fuentes hospederas invade el xilema de las raíces y tallos, interfiere fundamentalmente sobre el flujo ascendente del agua a través del xilema, disminuyéndolo hasta un valor que va del 2 al 4% del que fluye a través del tallo de las plantas sanas. En general, la velocidad del flujo del agua a través de tallos infectados es inversamente proporcional al número de vasos que ha quedado bloqueado por el patógeno y por las sustancias resultantes de la infección (Agrios 2005). La temperatura óptima del terreno para el desarrollo de este patógeno es de aproximadamente 25° C, a temperaturas inferiores a los 15° C, se observa muy pocos síntomas (Bejo 2011).

### ***Sintomatología***

Los síntomas de esta enfermedad son diversos, afecta todos los estadios fenológicos de las plantas, la infección es a nivel radical y puede ocasionar la muerte de la plántula antes y después de la emergencia. El patógeno penetra al disco basal a través de heridas en las raíces y ocasiona una necrosis del sistema vascular (Apaza y Mattos 2002).

Los primeros síntomas se muestran con hojas amarillentas y retorcidas, las cuales van muriendo inicialmente por la punta, durante las primeras etapas de la infección, toda la planta puede marchitarse, las raíces toman un color marrón oscuro y se pudren, es posible observar a medida que se desarrolla la infección, un desarrollo fúngico blanco en la base del bulbo que, en contraste con la podredumbre blanca de la cebolla, no contiene esclerocios. Si se corta longitudinalmente un bulbo infectado, se observará que el fondo del bulbo y la parte inferior de las diversas capas aparecen acuosos y de color gris claro (Bejo 2011) (Figura 1).





Figura 1. Plantación de cebolla afectada por hongo del genero *Fusarium* (A), bulbo con poco crecimiento, presenta corchosis y poco sistema radical (B).

### ***Medidas de manejo para la pudrición basal***

En Costa Rica se reporta poca información sobre el manejo de *Fusarium* sp en el cultivo de la cebolla, algunos reportes bibliográficos indican las siguientes formas de combate.

#### **Combate cultural**

La biofumigación se propone entre los métodos de desinfección de suelos amigables con el ambiente (Iriarte y Reybet, 2011). Este método ha sido utilizado y reportado como exitoso para control del genero *Fusarium* por Zhou 2004, donde publicó la reducción en la incidencia de *F. oxysporum*. f. sp. *niveum* en sandía (54-69%) con restos de *Vicia villosa*; además Ramírez y Muneke 1988, observaron que la población de *F. oxysporum. conglutinans* disminuyó un 20% con 8 t.ha<sup>-1</sup> de repollo cortado y seco.

Por otra parte la solarización es uno de los métodos culturales que ha presentado buenos resultados para el manejo de *Fusarium* sp en el suelo, Pulido et al 2009 reportan que es posible aumentar la producción al utilizar este método de desinfección del suelo comparándolo con uso de fungicidas químicos. Chan-Jung *et al* 2007, reportaron que la incidencia de la pudrición roja en cebolla se

redujo del 99.9% al 5.2% en las parcelas solarizadas y la severidad disminuyó de 80% a 20% en las parcelas solarizadas por 30 y 40 días con respecto al control.

### **Combate biológico**

Según Pulido et al (2009), el uso de hongos antagonistas como lo son *Trichoderma* spp, *Paecilomyces lilacinus* y *Bacillus subtilis*, son los más utilizados para el control biológico de *Fusarium oxysporum* bajo un manejo integrado de plagas. Khalil et al (2001), mencionan el uso de *Glomus* sp. Zac-19 y *Glomus aggregatum*, como micorriza arbuscular para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, la cual ataca el cultivo de la gladiola, las plantas presentaron una disminución en la pudrición de los bulbos en comparación al tratamiento testigo.

### **Combate químico**

García (2003), menciona el uso de bromuro de metilo, la cloropicrina y el metam-sodio como opciones para aplicar al suelo al momento del trasplante de la cebolla para evitar el ingreso de *Fusarium oxysporum* al sistema radical.

Se ha señalado además el uso de diferentes productos para la desinfección de suelos infestados. En este sentido en un documento desarrollado por Controladora de Plagas Forestales (2007), informa el uso de procloraz, tebuconazole y propiconazole con buenos resultados para el control del género *Fusarium* a nivel de campo, además de inhibición del crecimiento *in vitro* con el uso de difenoconazole, fludioxonil tebuconazoles.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El estudio se realizó en dos fases complementarias, ambas en ambientes controlados, uno a nivel de laboratorio y otro a nivel de invernadero; la primera fue la base para la siguiente. En la segunda etapa se propuso confirmar si los datos obtenidos a nivel *in vitro*, correlacionan con los resultados obtenidos en el invernadero, sin embargo solo los mejores cuatro químicos y dos biológicos del total de tratamientos fueron llevados a la segunda etapa por razones financieras.



## **Primera etapa**

### **Identificación del patógeno de cebolla con el uso de herramientas de biología molecular**

El aislamiento Fc31 fue cultivado en placas de petri con el medio de cultivo PDA enmendado con el antibiótico cloranfenicol, una semana después se colectó el micelio y se transfirió a un tubo de plástico de 1.5mL. Mediante el método de extracción propuesto por Rogers y Bendich (1988) para la obtención de ADN, se logró la obtención del material genético. La caracterización molecular del aislamiento se realizó con los iniciadores Ef1/Ef2 descritos por O'Donnell et al. (1998) debido a que se reconoce como una región diagnóstica para el género *Fusarium*.

### **Evaluación de la actividad fungicida de los productos seleccionados ante *F. oxysporum* en condiciones *in vitro***

#### **Ubicación**

La evaluación de la eficacia *in vitro* de los fungicidas seleccionados para la inhibición del patógeno *Fusarium oxysporum* se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Sede del Atlántico.

#### **Obtención de cultivos**

El aislamiento del patógeno en estudio se aisló de raíz de plantas enfermas provenientes de la zona norte de Cartago, específicamente de Tierra Blanca, zona cebollera por excelencia que han reportado infestaciones considerables por parte de este patógeno en años recientes, el material se mantiene como parte de una colección.

Este aislamiento fue utilizado en una investigación previa donde se obtuvo la forma monospórica y se comprobó los postulados de Koch, para determinar su patogenicidad y agresividad en las plantas de cebolla, además se realizó la caracterización del hongo por medio de técnicas de biología molecular. El mismo

fue seleccionado de otros tantos y resultó el más agresivo en cuanto a tiempo para presentar los síntomas de la enfermedad (Pérez 2014).

La patogenicidad del aislamiento seleccionado se evaluó sobre plantas de cebolla de almácigo reproduciéndose los síntomas respectivos de la enfermedad que se conoce en condiciones de campo.

### **Tratamientos**

Se realizó una prueba previa para valorar la eficacia *in vitro* de productos comerciales disponibles en el mercado, utilizados y promisorios para el combate de *Fusarium oxysporum*. Los productos evaluados se presentan en el cuadro 1.



**Cuadro 1.** Descripción de los productos fungicidas previamente evaluados *in vitro*.

Ingrediente activo	Nombre comercial	Grupo químico	Mecanismo de acción	Código FRAC (2015)
Benzimidazol	Mertect 50 SC	Thiabendazole	Inhibe la división celular y la mitosis, afecta la formación del uso acromático.	1 (riesgo alto a generar resistencia)
Dimetomorf	Forum 15 DC	Morfolina clorado	Altera la formación de la pared celular en todos los estados del ciclo de vida del hongo, excepto en la formación de zoosporas.	40 (riesgo de menor a medio)
Etridiazol + Metil tiofanato	Banrot 49 WP	Benzimidazol + tiadiazol clorado	Afecta la peroxidación de lípidos.	14 (resistencia baja o media) + 1 (riesgo alto a generar resistencia)
Extracto de <i>Melaleuca alternifolia</i>	Timorex 22,3 EC	Biológico	Rompe la barrera permeable de la pared y membrana celular del hongo, pérdida del control respiratorio de las células dejando libre el transporte de electrones, anula la actividad de la respiración mitocondrial.	----
Extracto de semillas de cítricos ( <i>Citrus sinensis</i> )	Fungal 60.5 SL	Biológico	Inhibe la estructura proteica.	----
Fludioxonil	Celest 2,5 FS	Phenylpyrrole	Inhibe la germinación de conidios y el crecimiento micelial. Afecta la trasducción osmótica.	12 (riesgo de menor a medio)
Iprodiones + carbendacina	Calidan 27,5 SC	Dicarboximide + Benzimidazol	Inhibidor de la transducción de señales en el patógeno en la mitocondria y el retículo endoplásmico. Inhibidor de la mitosis y la división celular	2 (riesgo medio a alto) + 14 (resistencia baja o media)

			(ensamblaje Beta-tubulina en mitosis).	
<b>Iprodione</b>	Rovral 50 WP	Dicarboximide	Inhibidor de la transducción de señales en el patógeno en la mitocondria y el retículo endoplásmico	2 (riesgo medio a alto)
<b>Metabolitos de <i>Lactobacillus</i></b>	Leafclean	Biológico	Ataque de la pared celular, de los hongos.	----
<b>Metconazol</b>	Caramba 9 SL	Triazol	Inhibe la síntesis de ergosterol.	3 ó DMI's (Demethylation Inhibitors)
<b>Procloraz</b>	Mirage 40 EC	Imidazoles	Inhibidor de la dimetilación del esteroles (14-dimetilación en la ruta de la biosíntesis del ergosterol de las células fúngicas; presumiblemente por ligazón a una función oxigenasa mixta constitutiva, involucrada en el metabolismo del esteroles fúngico.	3 ó DMI's (Demethylation Inhibitors)
<b>Pyraclostrobin</b>	Regnum 25 EC	Estrobilurina Clorado	Inhibe la respiración mitocondrial.	11 ó QoI's (Quinone outside inhibitors)
<b>Pyraclostrobin + boscalid</b>	Bellis 38 WG	Estrobilurina + Carboxamida	Afecta la cadena de respiración en la mitocondria. Inhibe la germinación de esporas impide la elongación del tubo germinativo, el crecimiento micelial y la esporulación. A nivel molecular inhibe la succinato deshidrogenasa, enzima que es parte importante en el Ciclo Krebs, y por lo tanto afecta el flujo de carbonos a los metabólicos como la cadena de ATP.	11 ó QoI's (Quinone outside inhibitors) + 7 ó SDHI (Succinate dehydrogenase inhibitors)



Para cada fungicida, se realizó una preparación de una solución madre con una concentración de 2000 µg.ml<sup>-1</sup>, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones por evaluar. El medio de cultivo utilizado fue papa dextrosa agar (PDA. Difco, Le Pont de Claix, Francia), al cual se le aplicó una alícuota de cada dilución de manera que se obtuvo en placa las siguientes concentraciones: 0,0; 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 µg.ml<sup>-1</sup>.

### **Evaluación de la eficacia *in vitro***

Del aislamiento monospórico se tomó un disco de 5 mm de diámetro del borde de una colonia de 7 días de establecida en medio de cultivo PDA. Este se colocó en el centro de las placas Petri en forma invertida, de manera que el micelio quede en contacto directo con el medio PDA con las concentraciones de los fungicidas. Las placas se incubaron a una temperatura entre 22°C y 24°C durante 8 días.

La inhibición del crecimiento del patógeno por el efecto del fungicida se estimó midiendo con una regla, el diámetro de la colonia del hongo en forma horizontal y vertical (diámetro más largo y más corto), y se calculó el promedio para la cepa en cada tratamiento, los seis mejores fungicidas químicos y los dos mejores fungicidas biológicos, que inhibieron el crecimiento del patógeno *Fusarium*, fueron los utilizados para la segunda etapa *in vivo*.

### **Selección de los tratamientos evaluados para la segunda etapa (*in vivo*)**

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se determinó mediante la fórmula propuesta por Cole et al (2005):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{diámetro promedio en PDA sin fungicida} - \text{diámetro promedio en PDA con fungicida}) \times 100}{\text{diámetro promedio en PDA sin fungicida}}$$

Estos datos fueron utilizados para generar la concentración efectiva media (EC<sub>50</sub>), o concentración de plaguicida que causa la muerte a la mitad de los individuos; (reducción del 50% en el avance del crecimiento diametral del micelio del hongo, en comparación con el testigo) la que sirvió como valor de referencia

para seleccionar los productos más efectivos para el control de *Fusarium oxysporum*.

Para obtener los valores de EC<sub>50</sub> correspondiente a la concentración de cada fungicida, se obtuvo el promedio de los valores de la inhibición los cuales se graficaron contra el logaritmo de las concentraciones del fungicida y se determinó la regresión lineal. El logaritmo de la EC<sub>50</sub> se calculó basado en la intercepción con el eje "x" que corresponde al valor del 50% de inhibición en la regresión lineal. Los valores de la EC<sub>50</sub> se calcularon como el antilogaritmo del resultado obtenido del logaritmo. Es decir, se reemplazó el valor "50" en las ecuaciones resultantes que relacionan la variable respuesta, el porcentaje de inhibición (y), con el logaritmo de la concentración del fungicida y se calculó el antilogaritmo.

## **Segunda etapa**

### **Evaluación de la eficacia de los productos seleccionados en plántulas de cebolla**

#### **Ubicación**

La prueba se realizó bajo un sistema controlado de invernadero en las instalaciones de la empresa Almácigos Pacayas, ubicada en Tierra Blanca de Cartago. Los datos climatológicos promedio anual son de lluvias de 2281 mm, días lluviosos 223, temperatura media de 16, 5 °C y humedad relativa de 88%.

Los datos climatológicos en cuanto a la temperatura y la humedad relativa (mínima/máxima diaria) se registraron a lo largo del periodo de evaluación con un termohigrómetro marca Taylor con una incertidumbre de  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ .

#### **Establecimiento del material vegetal**

El materia vegetal o variedad de cebolla utilizado en el trabajo fue la ALVARA de la casa comercial BEJO®, las semillas se cultivaron en bandejas de 200 hoyos, colocando sustrato (anexo 3) esterilizado con autoclave en el fondo de los mismos (turba Berger en mezcla con materia orgánica proveniente Hacienda Juan Viñas, relación 50-50), se colocó una semilla en cada punto y se cubrió con



no más del doble de su tamaño con más sustrato estéril. Las bandejas se colocaron en cámara de germinación durante los primeros 7 días donde se les mantuvo con condiciones de humedad mayores al 90%, de ahí pasaron a condiciones de invernadero.

### **Inoculación de la cepa de *Fusarium oxysporum***

#### ***Preparación del inóculo de Fusarium oxysporum***

Para la producción del inóculo se utilizó como referencia la metodología usada por Aguilar (2014); se prepararon platos petri con el medio de cultivo PDA más el antibiótico chloramphenicol, colocando micelio de la cepa Fc31 de la colección de aislamientos de *Fusarium oxysporum* de cebolla. Cada plato petri se incubó a una temperatura de 28° C hasta que el crecimiento del micelio cubrió la totalidad del área del plato.

Luego se procedió a tomar círculos de micelio de 0.5 cm de diámetro los cuales se colocaron en un frasco de Erlenmeyer con 26 gr de arroz (previamente esterilizado en dos ocasiones) con el propósito de que el hongo crezca sobre este sustrato. Los frascos Erlenmeyer fueron colocados en una incubadora a una temperatura de 28° C por espacio de 15 días hasta que las esporas del patógeno cubrieron por completo el arroz. El material se movió cada día con el fin de evitar que se aglomerase.

#### ***Inoculación de las plantas con Fusarium oxysporum***

La inoculación se realizó 7 días después de la siembra, momento en que se transfirió las bandejas al invernadero. Se aplicó a cada hoyo 5 gramos de arroz con inóculo del hongo *Fusarium*, para esto se utilizó un recipiente cuyo volumen pesó los 5 gramos del arroz inoculado.

Luego de transcurridos 8 días de la inoculación se tomó una muestra del sustrato para evaluar las poblaciones microbiológicas de suelo según la metodología descrita por Weaver et al (1994), y verificar la efectividad de la misma.

### Aplicación de los productos seleccionados

Los cuatro tratamientos químicos y dos biológicos con los mejores resultados en la etapa I, fueron seleccionados para la evaluación de la segunda etapa, se realizó la primera aplicación de los 13 días después de la inoculación (DDI), con el fin de brindar el tiempo suficiente para que haya ocurrido el proceso de infección y establecimiento del patógeno en el sustrato y las raíces de las plantas de cebolla, la segunda aplicación se realizó 15 días después. Se utilizó una bandeja de madera forrada con plástico para sumergir las bandejas por 45 segundos, la dosis utilizada fue la recomendada por el fabricante, para el uso en suelo, con un volumen total de mezcla de 10 litros, el pH del agua de grifo utilizada fue de 7, y se midió con cintas de pH.

En el cuadro 2 se muestra las dosis utilizadas.

**Cuadro 2.** Tratamientos seleccionados para el control de *Fusarium oxysporum* bajo condiciones controladas de invernadero.

Ingrediente activo	Dosis de producto comercial (ml ó g/litro)	pH final de mezcla*
Extracto de semillas de cítricos ( <i>Citrus sinensis</i> )	1,25	4,0
Fludioxonil	5,00	4,5
Metabolitos de <i>Lactobacillus</i>	5,00	4,5
Metconazol	1,25	4,5
Metil tiofanato\etridiazol	0,62	4,5
Procloraz	1,00	4,5
Pyraclostrobin + boscalid	1,00	4,5
Pyraclostrobin	0,75	4,5
T. absoluto 1 (con inóculo)	-----	

\*Medidas tomadas con cintas de medición de pH.

### Variables fitopatológicas

Al final de los 45 días de evaluación en invernadero, se tomó una muestra de sustrato compuesta por el contenido de 30 hoyos por cada repetición, el mismo se homogenizó y se llevó al laboratorio; donde se realizó microbiología del



sustrato (dilución  $10^{-2}$ ) según la metodología descrita por Weaver et al 1994, para determinar la presencia o ausencia de *Fusarium* y así la eficacia de los tratamientos.

### **Variables fisiológicas y de crecimiento**

Las variables fisiológicas y de crecimiento se evaluaron 45 días después de la siembra, final del ciclo del cultivo de cebolla en etapa de almacigo de invernadero, por medio de la medición de la clorofila, crecimiento y desarrollo de la planta (grosor del tallo (mm), número de hojas, altura a la aparición de las hojas (cm)), peso seco (g) y volumen radical ( $\text{cm}^3$ ) y longitud radical (cm).

El crecimiento de la base de las plantas hasta la aparición de las hojas se midió con ayuda de un vernier digital TRUPER, colocándolo desde la base de la planta hasta la aparición de la hoja más joven, el grosor del tallo se midió con el mismo equipo.

La medición de las variables referentes al sistema radical consistió en una muestra de las raíces de 30 plantas por repetición, las cuales fueron lavadas con agua de grifo, para eliminar la totalidad del sustrato, seguido se calculó la longitud (cm) y el volumen radical ( $\text{cm}^3$ ) utilizando el programa WinRhizo Pro versión 2004, fabricado por Regent Instruments.

El peso seco foliar (g), se determinó tomando 30 plantas por repetición, se lavaron sus raíces con agua de grifo para eliminar todo el suelo adherido, posteriormente se separaron las raíces del bulbo utilizando un bisturí, luego el área foliar de las plantas se colocó en una bolsa de papel en una estufa por un período de 3 días a una temperatura constante de  $70^{\circ}\text{C}$  para luego ser pesadas con balanza analítica.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado fue un irrestricto al azar ya que el ensayo se realizó bajo condiciones controladas de invernadero, se evaluaron cuatro repeticiones compuestas por bandejas de 200 hoyos con una semilla de cebolla por agujero por cada producto. Se descartaron los bordes al momento de las

evaluaciones para un total de 140 plantas por repetición, para un total de 560 plántulas, de estas se tomaran 30 plantas por repetición como submuestra para realizar dichas evaluaciones.

Los datos se analizaron con el software estadístico InfoStat versión estudiantil, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para el análisis de medias se aplicó la prueba de Fisher a una significancia del 5%. También se realizaron los análisis de supuestos para normalidad de datos y variabilidad de medias.

El modelo estadístico a utilizar estaría dado por:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente investigación se generó la línea base para la población del patógeno *Fusarium oxysporum*, que ha recibido tratamiento fungicida; los resultados obtenidos se consideran como una contribución para conocer la expresión del patógeno a los productos evaluados.

### **Identificación del patógeno de cebolla con el uso de herramientas de biología molecular**

Los resultados de la PCR con los iniciadores Ef1/Ef2, utilizando ADN del patógeno procedente de cebolla, generó un producto de aproximadamente 700pb (figura 2), el cual fue visualizado por medio de electroforesis en un gel 1.5% de agarosa, este resultado es similar al reportado por los autores originales de los iniciadores.

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en la compañía Macrogen, Inc. con centro de operaciones en Corea del Sur ([http://www.magrogen.com/eng/macrogen/macrogen\\_main.jps](http://www.magrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jps)). El alineamiento obtenido fue comparado en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante la análisis básico de alineamiento local (BLAST) search (ALTSCHUL et al. 1997), para lo que se obtuvo similitud en un 69% de cobertura y un 94% de entidad con *Fusarium oxysporum* (Liu et al 2014). Además tiene una similitud del 69% de cobertura y un 93% de entidad con *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (Mbofung et al 2007) (anexo 1)

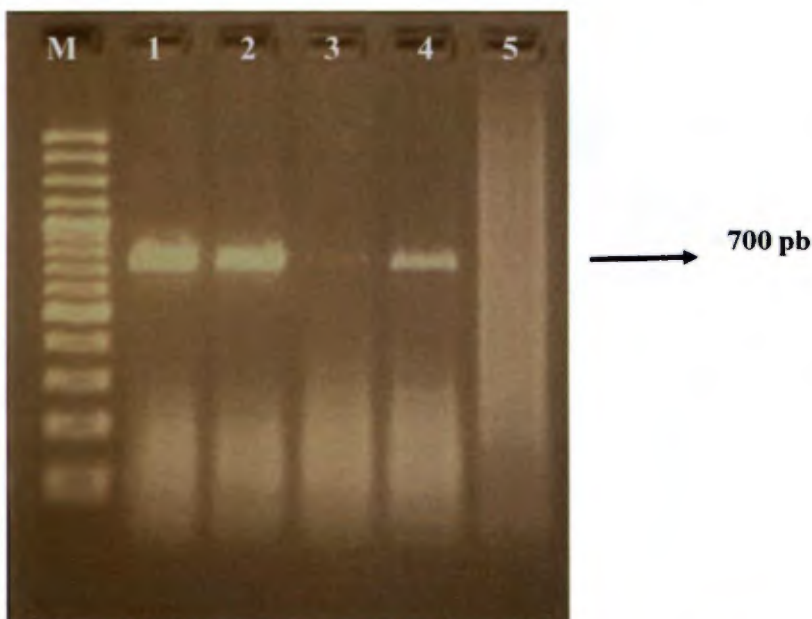


Figura 2. Electroforesis de productos de PCR generados con el uso de los iniciadores Ef1/Ef2: carriles M) marcador molecular de 100pb; 1-2-3) muestras de ADN de patógenos de cebolla; 4) control positivo; 5) control negativo sin ADN.

### **Primera etapa**

#### **Evaluación de los productos in vitro**

Los resultados con respecto al  $EC_{50}$  obtenidos en la presente investigación (cuadro 3), reflejan que el 62% de los fungicidas posee valores superiores a  $1 \text{ ug.ml}^{-1}$ ; referencia a partir de la cual se considera que hay riesgo de pérdida de la sensibilidad del patógeno (De Lapeyre de Bellaire y Dubois 1997); a este grupo, por lo que no serían adecuados utilizarlos dentro de una estrategia de control del patógeno. A diferencia del restante 38% de los fungicidas como metconazole, procloraz, boscalib-pyraclostrobin, pyraclostrobin, fludioxonil y metil tiofanat-etridiazol que presentan valores del  $EC_{50}$  inferiores al valor de referencia ( $1 \text{ ug.ml}^{-1}$ ); estos pueden ser utilizados dentro de un manejo integral del patógeno con prevención según código FRAC. Los mejores tratamientos biológicos basados en el valor  $EC_{50}$ , fueron el fermento de *Lactobasillus* y extracto de semillas de cítricos (*Citrus sinensis*).



**Cuadro 3.** Resultados de EC<sub>50</sub> (ug.ml<sup>-1</sup>) de las evaluaciones *in vitro*, valores código FRAC (2015)

Ingrediente activo	EC <sub>50</sub> (ug.ml <sup>-1</sup> )	Código FRAC	Resistencia
Metconazole *	0,00005	3 ó DMI's (demethylation inhibitors)	medio a alto
Procloraz*	0,00466	3 ó DMI's (demethylation inhibitors)	medio a alto
Boscalid / Pyraclostrobin*	0,52937	7 ó SDHI (succinate dehydrogenase inhibitors) / 11 ó Qol's (quinone outside inhibitors)	medio a alto riesgo / más alto
Pyraclostrobin*	0,61483	11 ó Qol's (quinone outside inhibitors)	más alto
Fludioxonil*	0,20792	código 12	menor a medio
Iprodione / Carbendacina	5,09707	código 2 / código 1	medio a alto / alto riesgo
Benzimidazole	2,97729		
Metil tiofanato / Etridiazol*	12,67988	código 1 / FRAC 14	alto / baja a media
Iprodione	8,77756	código 2	medio a alto
Extracto de semillas de cítricos ( <i>Citrus sinensis</i> ) *	67,19577	---	---
Dimethomorph	77,38398	código 40	bajo a medio
Fermentos de <i>Lactobacillus</i> *	Mayor 500	---	---
Aceite de <i>Melaleuca alteroifolia</i>	mayor 1000	---	---

\* Ingredientes activos seleccionados para la segunda etapa de evaluación.

Ivic y colaboradores (2011), presentan valores inferiores a 0,1 ug.ml<sup>-1</sup>, para la molécula metconazol, en hongos del género *Fusarium* de las especies *avenaceum* y *verticillioides*. Spolti et al, (2014) reportan también valores EC<sub>50</sub> inferiores a 0,1 ug.ml<sup>-1</sup> para pruebas *in vitro* contra *Fusarium graminearum*. Según lo anterior, se puede decir que el aislamiento utilizado para el metconazole, aun no presenta pérdida de sensibilidad a este ingrediente activo. Estos investigadores además reportan para procloraz, valores inferiores a 0,1 ug.ml<sup>-1</sup>, para *F.*

*graminearum*, *F. avenaceum* y *F. verticillioides*. Herrera et al (2011), y Gonzales et al (2012), reportan un 100% de efectividad para inhibir *in vitro* el crecimiento micelial del hongo *Fusarium solani*.

El tratamiento boscalid en mezcla con pyraclostrobin, esta reportado como fungicida que controla algunos representantes del género *Fusarium* (Rutgers 2012), sin embargo no ha sido muy estudiado hasta el momento para control de hongos de suelo; ha sido un fungicida utilizado principalmente para manejo de patógenos foliares.

El fungicida pyraclostrobin, presento un valor más alto que el reportado por Pérez (2014), para el caso de pruebas de sensibilidad para 10 aislamientos de *Fusarium* spp aislados de mazorcas de maíz; donde presentaron valores de EC<sub>50</sub> de 0,027 a 1,940 ug.ml<sup>-1</sup>, con una media de 0,524 ug.ml<sup>-1</sup>, siempre inferiores a 1 por lo que siguen siendo patógenos sensibles al fungicida.

El fungicida fludioxonil, presentó un valor de EC<sub>50</sub> promedio menor a 1 ug.ml<sup>-1</sup>, lo que coincide con el reportado por Amini y Sidovich (2010), para pruebas de sensibilidad en el agente causal *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 0,256 ug.ml<sup>-1</sup>. Peters et al (2008), obtuvieron valores de EC<sub>50</sub> con fludioxonil para aislamientos de *F. sambucinum* de 0,002 ug.ml<sup>-1</sup>, aislamientos de *F. coeruleum* también fueron sensibles a fludioxonil, con valores de EC<sub>50</sub> medias de 0,17 ug.ml<sup>-1</sup>. Otros aislamientos expuestos en pruebas *in vitro*, por los anteriores investigadores a fludioxonil, de *Fusarium coeruleum* y *Fusarium sambucinum* fueron resistentes, ya que no mostró una inhibición del crecimiento micelial, incluso a 100 mg de fludioxonilo por litro. Los autores mencionan que para ellos este es el primer informe de la resistencia a fludioxonil en los aislados de *Fusarium* spp y actualmente no se presentan más informes similares.

Metil-tiofanato en mezcla con etridiazol, presentó un valor de EC<sub>50</sub> mayor a 1 ug.ml<sup>-1</sup>, estos ingredientes activos se tomaron como referencia del tratamiento comercial, ya que ha sido uno de los productos más utilizados por los agricultores cebolleros para control de hongos edáficos. Rutgers (2012), lo reporta como controlador de *Phytophthora*, *Pythium*, *Thielaviopsis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*.



Rodríguez y Montilla (2002), determinaron efectos reductores sobre el crecimiento micelial del hongo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, con valores de  $EC_{50}$  de  $63 \text{ ug.ml}^{-1}$  con pruebas *in vitro* de extracto de cítricos (*Citrus paradisi*), el valor de  $EC_{50}$  encontrado en este trabajo, coincide con lo reportado por los autores.

Quiroz y colaboradores (2004), reportan que los *Lactobacillus* juegan un papel importante en el control de *Fusarium* sp; el  $EC_{50}$  obtenido para el producto a base de fermentos de *Lactobasillus*, fue mayor a  $500 \text{ ug.ml}^{-1}$ , este valor no se compara con los valores reportados por De Lapeyre de Bellaire y Dubois (1997), por ser un producto biológico.

Los tratamientos cuyos  $EC_{50}$  resultaron en promedio mayor a  $1 \text{ ug.ml}^{-1}$ , a partir del cual los aislamientos se consideran que han perdido la sensibilidad al ingrediente activo (De Lapeyre de Bellaire y Dubois 1997); son iprodiones en mezcla con carbendacina con un valor de  $EC_{50}$  de  $5,09707 \text{ ug.ml}^{-1}$ , benzimidazole con  $2,97729 \text{ ug.ml}^{-1}$ , dicarboximide en mezcla con prodione con valor de  $8,77756 \text{ ug.ml}^{-1}$ , dimethomorph con valor  $EC_{50}$  de  $77,38398 \text{ ug.ml}^{-1}$ , fermentos de *Lactobasillus* con  $EC_{50}$  mayor a  $500 \text{ ug.ml}^{-1}$ , extracto de cítricos (*Citrus paradisi*) y el aceite de *Melaleuca alteroifolia* con valor  $EC_{50}$  mayor a  $1000 \text{ ug.ml}^{-1}$ .

## **Segunda etapa**

### **Evaluación de la eficacia de los productos seleccionados en plántulas de cebolla**

Los valores de las variables evaluadas en la segunda etapa fueron estadísticamente analizados con LSD Fisher  $p=0,05$  y cumplen con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos (cuadro 4). Las plantas evaluadas con fermentos de *Lactobacillus* no se lograron evaluar, ya que el producto causó fitotoxicidad a las mismas.

La variable grosor (mm) de la base del tallo indica que el tratamiento 5 (fludioxonil), presenta mayor valor de media en comparación con el resto de los tratamientos con un valor de  $3,06 \text{ mm}$ , según LSD Fisher  $p = 0,05$ ; sin embargo estadísticamente no presenta diferencias significativas con los tratamientos 3 (boscalid-pyraclostrobin) con media de  $2,91 \text{ mm}$ , tratamiento 7 (extracto de

semillas de cítricos) con media de 2,87, el tratamiento 8 (testigo inoculado) con valor de grosor de tallo de 2,60 mm y el tratamiento 2 (procloraz) con valor de media de 2,79 mm. En orden descendente de grosor, el tratamiento 4 (estrobirulina-pyraclostrobin) y 6 (etridiazol) con valores de medias de 2,73 mm y 2,60 mm respectivamente, presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a fludioxonil (mayor grosor), sin embargo no las hay con todos los demás tratamientos mencionados. El único tratamiento que se presenta diferencias estadísticamente significativas es triazol con valor de media de 2,03 mm, lo cual se debe a que este ingrediente activo causó toxicidad a las plantas tratadas. El grosor del tallo es importante considerarlo en plantas de almácigo antes de llevarlas a campo abierto, ya que la capacidad de sobrevivencia en condiciones climáticas adversas tanto de estrés hídrico como de alta humedad, depende en parte de las condiciones óptimas en el desarrollo fisiológico de las plantas. Plantas con tallos más gruesos, mantienen durante más tiempo la turgencia por lo que se evita el volcamiento de las mismas y por ende el contacto de las hojas con el suelo caliente que causa daños mecánicos en los tejidos por las altas temperaturas.

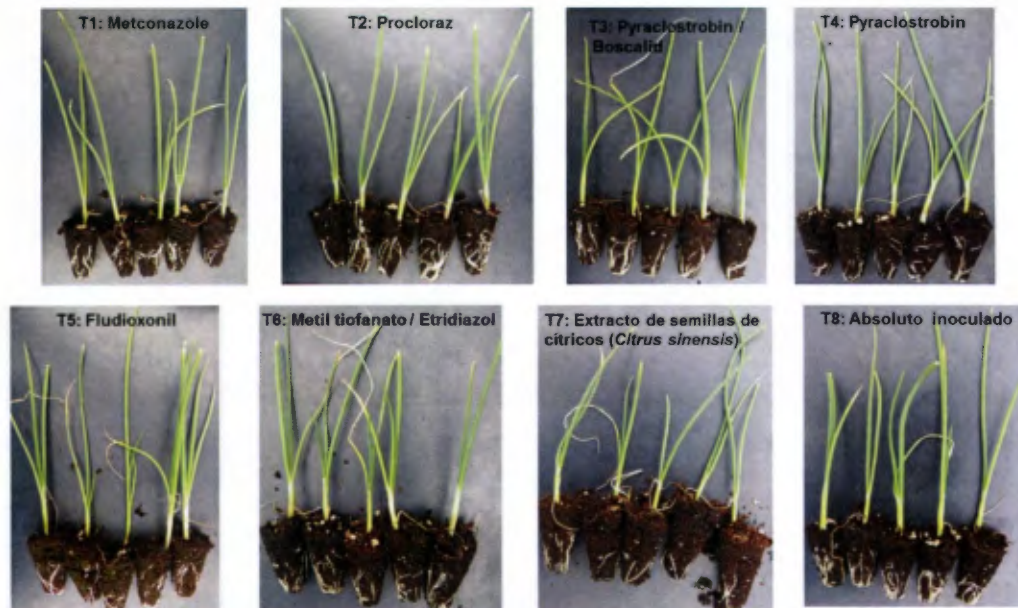


Figura 3. Plantas de cebolla evaluadas al final del ciclo de desarrollo en invernadero.



La variable longitud de raíces no presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos, pero los valores más altos se encontraron en los tratamientos procloraz y fludioxonil (anexo 6). Esta condición de mayor longitud de raíz aunado con el mayor grosor del tallo que se observaron en estos tratamientos, sugieren una buena condición de la planta para almácigo.

El tratamiento con triazol, estuvo relacionado con plantas con menor longitud de sistema radical y valores menores de grosor de tallo, sin embargo; aun cuando este tratamiento presentó los mejores resultados en control del patógeno en la primera etapa, tiene un efecto fitotóxico en etapas temprana del desarrollo de la planta, lo que no se observa en plantas más desarrolladas.

Es importante contemplar lo anterior para futuras investigaciones donde se lleve los tratamientos hasta etapas finales del cultivo, así como la utilización de otros tipos de sustratos en invernaderos o plántales realizados en el suelo, ya que la expresión de las características de cada fungicida es probable que dependa en gran medida del sustrato donde sea aplicado.

**Cuadro 4.** Valores promedio de variables evaluadas en plantas de cebolla tratadas con diferentes ingredientes activos, inoculadas con *Fusarium oxysporium*.

INGREDIENTE ACTIVO	GROSOR DE TALLO (mm)	LONGITUD RADICAL (cm)	VOLUMEN RADICAL (cm <sup>3</sup> )	BIOMASA (g)	ALTURA DE PLANTA (cm)
Metconazol	2,03 D	31,12 D	3,22 A	0,03 C	2,59 B
Procloraz	2,79 B C	43,48 A	8,57 D	0,05 A B	3,19 A
Pyraclostrobin / Boscalid	2,91 A B	40,59 A B	7,80 C D	0,04 A B	2,63 B
Pyraclostrobin	2,73 B C	37,29 B C	5,16 B	0,04 B C	2,74 A B
Fludioxonil	3,06 A	42,99 A	7,19 C D	0,04 A B	2,63 B
Metil tiofanato / etridiazol	2,60 C	38,05 B C	5,11 B	0,04 B C	2,72 A B
Extracto de semillas de cítricos ( <i>Citrus sinensis</i> )	2,87 A B C	33,95 C D	4,65 A B	0,03 C	2,75 A B
Absoluto inoculado	3,00 A B	39,53 A B	6,17 B C	0,04 A B	2,49 B

Rojo: valor más alto. Verde: segundo valor más alto. Amarillo: tercer valor más alto. Letras iguales significan valores sin diferencias estadísticamente significativas según análisis Fisher.

Las moléculas boscalid-pyraclostrobin (tratamiento 3), estuvo relacionado con plantas que presentaron valores similares estadísticamente con los tratamientos antes mencionados, por lo que se puede referir a estos productos



como opciones dentro de un manejo integrado de producción de almácigo de cebolla en invernadero, donde se puede hacer rotación de moléculas en las aplicaciones preventivas, así evitando una posible resistencia por parte del patógeno, con la ventaja de que pertenecen a códigos FRAC diferentes.

Por otra parte al analizar los datos obtenidos para la variable volumen radical ( $\text{cm}^3$ ), la prueba estadística LSD Fisher  $p = 0,05$ ; que evidenció que ninguno de los tratamientos evaluados presentaron una influencia significativa, sin embargo, se puede notar que al aplicar procloraz, las plantas presentaron un valor de volumen radical mayor, seguido por el 3 (boscalid-pyraclostrobin) y 5 (fludioxonil), estadísticamente estos tratamientos son similares entre sí. Es importante considerar que esta característica es de gran importancia en el momento del trasplante a nivel de campo, ya que se considera que plantas con mayor sistema radical son capaces de realizar el proceso de adsorción de nutrientes provenientes del suelo ya sea por parte de las fertilizaciones como abonos químicos y o materia orgánica; por ende mayor capacidad de un desarrollo inicial de la planta lo que a su vez repercute en la sanidad de la misma ya que una planta con condiciones equilibradas de nutrición, presenta mayores ventajas en cuanto a plagas y enfermedades. Lo anterior se refiere siempre y cuando las plantas sean cultivadas en un suelo sano ya que el contacto de un mayor sistema radical con un suelo rico en materia orgánica y biota edáfica, favorece la retroalimentación planta-suelo, donde en una relación positiva se benefician las condiciones de rizósfera lo que favorece las capacidades competitivas de esta planta frente a otra.

Al considerar la variable de respuesta biomasa (g), para las plantas analizadas no se detectó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Fisher  $p = 0,05$ ), no obstante es válido mencionar que las plantas que crecieron en un medio con el tratamiento procloraz presentaron el valor más alto para peso seco de área foliar, seguido por aquellas expuestas al tratamiento fludioxonil y 8, este último es el tratamiento testigo, las similitudes en cuanto a biomasa aérea del testigo frente a plantas tratadas, se puede explicar cómo una respuesta estructural al ataque de patógenos, donde se da engrosamiento del



bulbo (corchosis). El tratamiento metconazol presentó menor valor biomasa expresada en gramos de peso seco, además menores resultados positivos en variables de sistema radical, sin embargo fue el de mejor control contra el patógeno en la etapa de *in vitro* y a nivel de invernadero; esto plantea interrogantes que deberán ser analizadas en futuras investigaciones; ya que bajo condiciones de un desarrollo mayor de las plantas, donde la etapa de la planta no sea susceptible al producto, es una herramienta muy importante para control del patógeno del género *Fusarium*.

Para la variable altura de planta (cm), el estadístico LSD Fisher  $p = 0,05$ , no detectó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, sin embargo; el tratamiento 2 (procloraz) presentó un valor mayor de altura a la aparición de la primera hoja, este tratamiento es el que se ha encontrado los mejores valores de todas las variables evaluadas.

Las plantas tratadas con el ingrediente activo procloraz, en general fueron las que mostraron mayor cantidad de características deseadas, el valor de Koc o coeficiente de adsorción de carbono orgánico (medida de la distribución del compuesto entre el suelo y la fase líquida) de este producto es de 500 ppm, lo que significa que por cada partícula libre en la solución del suelo, quedan 500 ppm partículas adsorbidas al suelo; y la vida media es de 120 días, lo que indica que tiene una moderada absorción por lo que controla el patógeno a nivel de suelo y a nivel de tejido interno. Además de la vida media que sobrepasa los días evaluados; por lo tanto es una excelente herramienta para ser utilizada en etapas donde las plantas de cebolla ya están infestadas con el patógeno.

Fludioxonil, tiene un valor de Koc de 145600 ppm y un valor de vida media de 239 días, esto indica que su adsorción es extremadamente fuerte, por lo tanto el control que esta molécula química puede tener sobre el patógeno es meramente preventiva, si el patógeno está en el interior de la planta, esta molécula no se moverá al interior para dar un control, sin embargo; en este ensayo se obtuvieron resultados positivos inoculando las plantas, esto se puede explicar con el hecho de que el fungicida controla el hongo presente en el sustrato y en la rizósfera, posiblemente la concentración de patógeno dentro de la planta no fue el suficiente

como para reflejar disminución en las variables grosor de tallo, longitud radical, volumen radical, biomasa y altura de la planta.

La molécula del metconazole tiene un valor de koc de 1,710 ppm y un valor de vida media de 84 días, estas características lo hacen una herramienta ideal para su uso en condiciones curativas cuando ya la planta esta infestada con el patógeno, sin embargo es importante considerar que a pesar de ser un activo que controla el hongo *Fusarium*, causó síntomas de toxicidad en las plantas evaluadas, por lo que es importante utilizarlo en plantaciones ya establecidas en campo con un sistema radical más fuerte, o realizar pruebas usando dosis más bajas.

Los valores obtenidos de las plantas del tratamiento testigo (absoluto inoculado), presentan datos altos de las variables evaluadas, estos resultados son a causa de los efectos causados por el hongo *Fusarium* en las plantas, donde el patógeno, al invadir el xilema de las raíces y tallos, interfiere fundamentalmente sobre el flujo ascendente del agua a través del xilema, por lo que se da una acumulación de los nutrientes adsorbidos vía raíz, en la base del bulbo, de ahí el efecto en el grosor del tallo, longitud y volumen radical y por ende biomasa.

La evaluación final se basó en la determinación de UFC (unidades formadoras de colonias) de *Fusarium* en el sustrato, donde se obtuvo los resultados del siguiente cuadro:

**Cuadro 5.** Resultados de evaluación final del sustrato de plantas tratadas con distintos ingredientes activos fungicidas.

Ingrediente activo	Presencia <i>Fusarium</i>	Koc
Metconazol	Si	1,710
Procloraz	Si	500
Pyraclostrobin / Boscalid	Si	9304 / 2,6
Pyraclostrobin	Si	9304
Fludioxonil	Si	145600
Metil tiofanato / etridiazol	Si	No disponible
Extracto de semillas de cítricos ( <i>Citrus sinensis</i> )	Si	No aplica
Absoluto inoculado	Si	No aplica



Es importante mencionar que las heridas en el sistema radical causadas por nematodos, otros hongos edáficos, prácticas culturales u otros factores; favorecen el ingreso de *Fusarium*, incluso las mismas aplicaciones de los productos químicos, puede causar lesiones en el sistema radical que favorezcan su ingreso; por lo tanto es importante considerar evitar causar esas heridas si no estamos controlando efectivamente el hongo. Como se puede observar en el cuadro 5, ninguno de los tratamientos logro eliminar en su totalidad el patógeno, sin embargo basados en la discusión anterior de las variables, podemos afirmar que a pesar de la presencia del hongo en el sustrato, las plantas logran su crecimiento y desarrollo; es posible que los fungicidas no permitieran la infección de las plantas.

## CONCLUSIONES

1. El patógeno utilizado tiene una similitud del 69% de cobertura y un 93% de entidad con *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*; información importante por considerar para futuras investigaciones, según la comparación del alineamiento con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante la análisis básico de alineamiento local (BLAST).
2. Los resultados con respecto al EC<sub>50</sub> reflejan que el 62% de los fungicidas evaluados posee valores superiores a 1 ug.ml<sup>-1</sup>; referencia a partir de la cual se considera que hay riesgo de pérdida de la sensibilidad.
3. El 38% de los fungicidas (metconazole, procloraz, boscalib-pyraclostrobin, pyraclostrobin, fludioxonil y metil tiofanat-etridiazol) presentan valores del EC<sub>50</sub> inferiores a 1 ug.ml<sup>-1</sup>; por lo que pueden ser utilizados dentro de un manejo integral del patógeno con prevención según código FRAC, siempre y cuando se tengan los registros necesarios para su uso en cebolla.
4. La variable grosor de tallo (mm) no presentó un tratamiento con diferencias significativas positivas, sin embargo el fludioxonil presentó un valor mayor, característica deseada por los agricultores cebolleros.
5. La variable de respuesta longitud radical, según LSD Fisher  $p = 0,05$  no hay tratamientos totalmente significativos, aunque el tratamiento 2 (procloraz) y el tratamiento 5 (fludioxonil) muestran las medias más altas.
6. No se detectó diferencias significativas para la variable volumen radical (cm<sup>3</sup>), según LSD Fisher  $p = 0,05$ ; sin embargo, el tratamiento 2 (procloraz) es el que marcó mayor valor de volumen radical, seguido por el 3 (boscalid-pyraclostrobin) y 5 (fludioxonil).



## RECOMENDACIONES

1. Realizar aislamiento y caracterización genética de muestras de más zonas cebolleras del país, ya que en esta investigación se utilizó material exclusivo de la zona alta de Cartago, así como determinar si en la zona de Cartago se presentan otras especies de *Fusarium* afectando este cultivo.
2. Es importante contemplar lo anterior para futuras investigaciones donde se lleve los tratamientos hasta etapas finales del cultivo, o sea en condiciones de campo, así como incluir un testigo absoluto sin inocular y determinar incidencia y severidad de la enfermedad.
3. Es valioso evaluar otros tipos de sustratos en invernaderos o planteles realizados en el suelo, ya que la expresión de las características de cada fungicida dependerá en gran medida del sustrato donde sea aplicado.
4. Es significativo para futuras investigaciones la utilización de más ingredientes biológicos, así como el uso de microorganismos biológicos, ya que la agricultura está tomando un giro hacia una producción más sostenible con el medio ambiente, esto implicaría otro tipo de metodologías de evaluación.
5. Es importante en futuras investigaciones realizar las pruebas y evaluaciones bajo condiciones de distintos gradientes de concentración de fungicida, esto con el fin de determinar si en esa etapa es posible utilizar concentraciones menores y se dé un buen efecto de control del patógeno.

## SUGERENCIAS AGRONOMICAS

1. Utilizar en el cultivo de cebolla dentro de un manejo integrado de plagas, productos a base de metconazole, procloraz, boscalib-pyraclostrobin, pyraclostrobin, fludioxonil y metil tiofanato-etridiazol, siempre y cuando existan registros de uso en el país.
2. Tener en consideración que los ingredientes metconazole y procloraz comparten el mismo código FRAC; así como boscalib-pyraclostrobin y el producto con solo pyraclostrobin.
3. Utilizar los productos a base de semillas de cítricos, metabolitos de *Lactobasillus* y el metconazole, en etapas más avanzadas del ciclo de cultivo, para evitar o reducir la fitotoxicidad.
4. En caso de infecciones graves de *Fusarium*, es posible sugerir la mezcla de fludioxonil con cualquiera de los otros ingredientes activos estudiados siempre y cuando existan registros de uso en el país.



## REFERENCIAS

- Aguilar, J. 2014. Identificación de los factores bióticos (Hongos, Nematodos) y abióticos (Nutrición) que producen el deterioro radical en el cultivar Gros Michel (Musa AAA) en asocio con café en el cantón de Turrialba, Costa Rica
- Agrios, G. 2005. Fitopatología. Ed. Limusa, México, 838 p.
- Apaza, W; Mattos, L. 2002. Reacción de cultivares de cebolla a la pudrición del disco basal causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. . Anales Científicos UNALM Perú. 304 – 3012 p.
- Bejo, 2011. Enfermedades y plagas importantes en cebolla. Folleto. The Netherlands. 37 p.
- Chan-Jung L., Jong-Tae L., Jin Seong M. et al. 2007. Effects of solar heating for control of pink root and other soil-borne diseases of onion. Plant Pathol. J. 23(4):295-299 p.
- Cole T., Cole C., Conway E. 2005. Effectiveness of selected fungicides applied with or without surfactant in controlling anthracnose on three cultivars of *Euonymus fortunei*, Journal of Applied Horticulture. (7):16-19 p.
- Controladora de Plagas Forestales. 2007. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell: Conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su control en *Pinus radiata*. Informe Final 2003-2007. Universidad de Concepción. Chile. 191 p.
- De Lapeyre De Bellaire L., DUBOIS C. 1997. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadalupe banana plantations. Plant Disease 81:1378-1383
- FAO. 2006. Conservación de los recursos naturales para una Agricultura sostenible El manejo de los residuos de cultivos, de los cultivos de cobertura y de la rotación de cultivos. 26 p.
- García, M. 2003. Plagas, enfermedades y fisiopatías del cultivo de la Cebolla En la Comunida de Valencia. Generalitat Valenciana. 114 p.
- Gonzales, J; Cbrera, R; Falcon, L; Batista, N. 2012. Evaluación *in vitro* del efecto de fungicidas químicos sobre los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* (pat.) griffon & maubl., *Fomitiporia maxonii* murrill. y *Fusarium* sp. link. aislados de plantas de cítricos. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. CitriFrut 29(2):8-11.

Granados, M. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación del efecto antagonista de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la pudrición blanca de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 105 p.

Herrera, E; Perez, I; Alejo, J; Tun, J; Ruiz, E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (mart.) sacc. y *Alternaria alternata* (fries) keissler en *Thevetia peruviana* (pers.) k. schum. y su control *in vitro*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana, Cuba. Fitosanidad, vol. 15, núm. 4, diciembre, 2011, pp. 231-236

Jahanshir Amini, J; Sidovich, D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with fusarium wilt of tomato. Journal of Plant Protection Research. Rusia. Vol. 50, No. 2

Iliarte, L; Sosa, M; Reybet, G. 2011. Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de *Fusarium oxysporum* en suelo. Universidad Nacional del Comahue Cinco Saltos. Argentina. 7 p.

Ivic, D; Sever, Z; Kuzmanovska, B. 2011. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and procloraz. Pestic. Phytomed. (Belgrade), 26(1), 2011, 35-42

Jaén, L; Azofeifa, L. 2010. Sector Agropecuario Políticas y Acciones para la Cadena Productiva de Cebolla. SEPSA. Programa Nacional Cebolla. Costa Rica. 15 p

Khalil, A; Cetina, V; Ferrera, R; Mendoza, J; Pérez, C; Larque, M. 2001. Hongos micorrizicos arbusculares como componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. en gladiola. Terra Volumen 19 Numero 3, 2001. México. 6 p.

Koike, S; Gladders, P; Paulus, A. 2007. Vegetable Diseases. Manson Publishing. 449 p.

Lardizabal, R. 2007. Manual de producción el cultivo de la cebolla. Entrenamiento y desarrollo de agricultores. EDA. Honduras. 38 p.

Liu,X; Gao, J; Lu,B. 2014. *Fusarium oxysporum* strain CAXC13701 translation elongation factor 1-alpha (EF-1alpha) gene, partial cds. Agronomy College, Jilin Agricultural University, Xincheng Street No. 2888, Changchun, Jilin 130118, China

MAG. 1991 Aspectos Técnicos de 45 Cultivos Agrícolas de Costa Rica. 560 p.



MAG. 2007. Caracterización de la Agro cadena regional de cebolla. Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección Regional Chorotega. Costa Rica. 33 p.

Mbofung, G.C., Hong, S.G. and Pryor, B.M. 2007. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolate NRRL22538 translation elongation factor 1 alpha (EF-1alpha) gene, partial cds. Plant Sciences, University of Arizona, 1145 E 4th St., Tucson, AZ 85721, USA

McDonald, M R. 1994. Basal root *Fusarium oxysporum* f. sp. In Diseases and pests of vegetable crops in Canada, edited by R. J. Howard, G. J. A and W. L. Seaman. Ottawa, Ontario, Canada: The canadian Phytopathological Society. 17 p

Montes-Belmont, R., R. Nava-Juárez, H. E. Flores-Moctezuma, y M. Mundo-Ocampo. 2003. Hongos y Nematodos en Raíces y Bulbos de Cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21-3:300-304 p.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. (95): 2044–2049.

Pérez, G. 2014. Caracterización morfológica y molecular de patógenos asociados con el cultivo de cebolla (*Allium cepa*) a nivel de la raíz, en la zona Norte de Cartago. UCR Turrialba. Informe Final Proyecto de Investigación 510-B2-280 UCR  
Proyecto 9 p

Pérez, J. 2014. Sensibilidad a fungicidas de las especies de *Fusarium* responsables de la pudrición de la mazorca de maíz. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Colegio de Postgrados. 58 p.

Pulido, A; Cervantes, L; Zavaleta, E; Grimaldo, O. 2009. Alternativas De Control Para La Pudrición Radical De La Cebolla En El Valle De La Trinidad, Baja California, México. Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. 10 p.

Quiroz A, Albertin A, Blázquez M. 2004. Elabore sus propios abonos insecticidas y repelentes organicos. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje. AVINA. 36p.

Ramirez, J.; Munneke, D. 1988. Effects of solar heating and soil amendements of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f.sp *conglutinans* and other organims. Phytopath. 3(78): 289-295 p.

Rodríguez, D; Montilla, J. 2002. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. Venezuela. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p. 46-50.

Rogers So, Bendich AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin SB, Schilperoort RA (eds) Plant Molecular Biology Manual. Boston, MA: Kluwer Academic Publisher. pp A6:l-10.

Rutger. 2012. Disease control recommendations for ornamental crops. Section II Synthetic Fungicides and Bactericides, Biopesticides, and Biorational Products for use in Ornamental Crops: Common Names and Trade Names. The State University of New Jersey.

Salazar, C. 2003. Análisis de la Cadena Agroalimentaria de la Cebolla en Costa Rica. UNED. Costa Rica. 26 p.

SEPSA. 2011. Boletín Estadístico Agropecuario –Nº21. San José C.R. 203 p.

Serrano, I; Mora, U. 2007. Sistematización de la agro cadena cebolla. Ministerio de Producción. Dirección Central Oriental. 55 p

VADEAGRO. 2006. Productos fitosanitarios para la protección de los cultivos. 3ra ed. Tomo I. Guatemala. 113-128 p

Vincelli, P C, y Lorbeer J. W. 1990. Root rot of onion caused by *Pythium irregulare* and *Pythium coloratum*. Mycopathologia 111:67-72 p.

Weaver, F; Angle, J; Bottomley, P. 1994. Part: Methods of soil analysis. Microbiological and biochemical properties. Number 5. US Soil Science Society of American Book Series 1121

ZHOU, X. 2004. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by soil amendement with Hairy vetch. Plant Dis. (88)12:1357-1365 p.



## ANEXOS

### Anexo 1. Secuencia genética de análisis del aislamiento Fc31.

>Fc31

```
GTATACGATACTCTCTATAAAAAGCTACCCGATATAACACACACACACCAACCA
CCGCCAACAGAGTGTGACAGGATGGGAGGAACCCAGTGTTACATGTTCTCCTC
GATGCAAATCACCGGTGACCCGGGAGCGTCCTGGATGATATGTTACTACGAC
ACACAACCTAGAATCAAGCACCAGCGACAACATAACCAATGACGGTGACATAGTA
GCGAGGAGTCTCGAACTTCCAGAGAGCAATATCGATGGTGATACCACGCTCA
CGCTCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCAGGCGTACTTGAAGGAACCCCTTAC
CGAGCTCAGCGGCTTCCTATTGTTGAGTGGTTAGTACTGCTTGACACGTGA
CGACGCACTCATTGAGGTTGTGAGAATGGTAAGAGGGCAAACGCTCCCGTCG
CTCAAGTGGCGGGGTAAGTGCCCCACCAAAAAAATTACGGTCATATTGCAAAA
TTTTTGGTCTCGAGCGGGGTAGCGGGCACGTTTCGAGTCGTAGGGGAAATCG
ATGGTGCAAAGGACGCGCGATTGAAAGGAAAATGACTAACCTTCTCGAATCTT
CTCGATGGTTCACTTGTCAATACCACCGCACTGGTAGAATCAAGTGACCAGTC
TGTGTAACGATATAAGTATGATAGACTTTGAGAAATACCCAGCCTAGGTCT
TGGACTGGGATTGATCGATCGTTTGATATGATTTTTTTCATCGAGTCTCTAAGAG
ATTCCTCGTAGTCCTTGATATAGCTATTCGGAAGTAGTAGGGAGCGAAGTGTG
ACTTAAAGTTTAGTCGTCAGTGCGTCTGGCTAAATCAAACCTGTTGTTGGTTTTT
ATTTGATTGCTTTATACAGCGTAGACTCGTCTATGAGATGAACT
```

### Anexo 2. Lista de tratamientos utilizados en la etapa de invernadero, valor Koc, vida media y resultado final de microbiología de sustrato.

Ingrediente activo	Tratamiento	Koc	Vida media (días en suelo franco)	Presencia <i>Fusarium</i> análisis sustrato final de las evaluaciones
Metconazol	1	1,710	84	Si
Procloraz	2	500	120	Si
Pyraclostrobin / Boscalid	3	9304 / 2,6	32 / 200	Si
Pyraclostrobin	4	9304	32	Si
Fludioxonil	5	145600	239	Si
Metil tiofanato / etridiazol	6	No disponible	No disponible	Si
Extracto de semillas de cítricos ( <i>Citrus sinensis</i> )	7	No aplica	No disponible	Si
Absoluto inoculado	8	No aplica	No disponible	Si

**Anexo 3.** Análisis químico del sustrato orgánico proveniente Hacienda Juan Viñas, utilizado para el cultivo de las semillas de cebolla.

<b>ANÁLISIS QUÍMICO DE ABONOS ORGÁNICOS</b>																
ID USUARIO	%						mg/kg					%	H <sub>2</sub> O	mS/cm	%	Relación
	N	P	Ca	Mg	K	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	HUM	pH	CE	C	C/N
SUSTRATO	1,29	0,12	1,59	0,32	0,38	0,16	3270	20	43	117	20	72	6,0	3,5	44,61	34,6

**Anexo 4.** Técnica de recuento de poblaciones microbianas en el suelo

De cada muestra se toma 5 g de sustrato, los que se colocan en un erlenmeyer con 45 mL de agua estéril, los mismos se agitan a 120 rpm por 15 minutos, el resultado lo llamamos dilución de  $10^{-1}$  (solución madre). Luego, en una cámara de flujo laminar, se toma con una pipeta graduada 1 mL de la solución madre, la cual se coloca en un tubo de ensayo con 9 mL de agua estéril, para obtener la dilución  $10^{-2}$ , de esta última se toma 1 mL y se coloca en otro tubo de ensayo que contenga 9 mL de agua destilada esteril, este procedimiento se repite en hasta llegar a la disolución  $10^{-4}$ .

Para el crecimiento de los hongos se colocara 1mL de las disoluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  en el medio de cultivo PDA (papa – dextrosa - agar) mezclado con el antibiótico Cloranfenicol. Las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  se colocan en placas Petri con Agar Nutritivo para el crecimiento de las bacterias y actinomicetes.

**Anexo 5.** Valores de pH de las muestras de sustrato para determinación de presencia del patógeno al final de las evaluaciones.

Identificación	pH	Identificación	pH
T1R1	5,70	T5R1	5,60
T1R2	5,85	T5R2	5,85
T1R3	5,90	T5R3	5,80
T1R4	5,90	T5R4	5,50
T2R1	5,75	T6R1	5,80
T2R2	5,45	T6R2	5,85
T2R3	5,60	T6R3	5,75
T2R4	5,90	T6R4	5,70
T3R1	5,75	T7R1	5,80
T3R2	5,75	T7R2	5,55
T3R3	6,00	T7R3	5,80
T3R4	5,65	T7R4	5,85



T4R1	5,70	T8R1	5,55
T4R2	5,65	T8R2	5,70
T4R3	5,50	T8R3	5,60
T4R4	5,65	T8R4	5,65

**Anexo 6.** Análisis estadísticos de variables con significancia estadística menor a 0,05, según prueba de Fisher.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Grosor de tallo (mm)	320	0,20	0,18	22,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	29,63	7	4,23	10,89	<0,0001
Tratamiento	29,63	7	4,23	10,89	<0,0001
Error	121,28	312	0,39		
Total	150,92	319			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,27431

Error: 0,3887 gl: 312

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
5,00	3,06	40	0,10	A
8,00	3,00	40	0,10	A B
3,00	2,91	40	0,10	A B
7,00	2,87	40	0,10	A B C
2,00	2,79	40	0,10	B C
4,00	2,73	40	0,10	B C
6,00	2,60	40	0,10	C
1,00	2,03	40	0,10	D

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

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RAIZ Longitud	32	0.69	0.60	8.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	509.73	7	72.82	7.72	0.0001
Tratamiento	509.73	7	72.82	7.72	0.0001
Error	226.52	24	9.44		
Total	736.25	31			

Test:LSD Fisher Alfa=0.05 DMS=4.48354

Error: 9.4383 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
2.00	43.48	4	1.54 A
5.00	42.99	4	1.54 A
3.00	40.69	4	1.54 A B
8.00	39.53	4	1.54 A B
6.00	38.05	4	1.54 B C
4.00	37.29	4	1.54 B C
7.00	33.95	4	1.54 C D
1.00	31.12	4	1.54 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	89,12	7	12,73	7,64	0,0001
Tratamiento	89,12	7	12,73	7,64	0,0001
Error	40,00	24	1,67		
Total	129,13	31			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,88417

Error: 1,6668 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.
1,00	3,22	4	0,65 A
7,00	4,65	4	0,65 A B
6,00	5,11	4	0,65 B
4,00	5,16	4	0,65 B
8,00	6,17	4	0,65 B C
5,00	7,19	4	0,65 C D
3,00	7,80	4	0,65 C D
2,00	8,57	4	0,65 D

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



**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Biomasa	32	0,60080	0,48437	12,76850

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,00089	7	0,00013	5,16012	0,0011
Tratamiento	0,00089	7	0,00013	5,16012	0,0011
Error	0,00059	24	0,00002		
Total	0,00148	31			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00725**

Error: 0,0000 gl: 24

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
2,00	0,04760	4	0,00248	A	
5,00	0,04288	4	0,00248	A	B
8,00	0,04190	4	0,00248	A	B
3,00	0,04173	4	0,00248	A	B
6,00	0,03660	4	0,00248		B C
4,00	0,03603	4	0,00248		B C
7,00	0,03443	4	0,00248		C
1,00	0,02993	4	0,00248		C

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

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura de planta (cm)	319	0,03	0,01	42,74

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,09	7	1,73	1,28	0,2588
Tratamiento	12,09	7	1,73	1,28	0,2588
Error	419,02	311	1,35		
Total	431,11	318			

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,51151**

Error: 1,3473 gl: 311

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
2,00	3,19	40	0,18	A	
7,00	2,75	40	0,18	A	B
4,00	2,74	39	0,19	A	B
6,00	2,72	40	0,18	A	B
3,00	2,63	40	0,18		B
5,00	2,63	40	0,18		B
1,00	2,59	40	0,18		B
8,00	2,49	40	0,18		B

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