

**Eficacia biológica *in vitro* de seis fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schltdl.
sensu lato, patógeno del cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duchesne ex
Rozier) en Costa Rica**

Marialicia Vega López

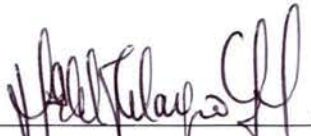
**Tesis para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de
Licenciada en Agronomía**

**Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Agronomía
2022**

Eficacia biológica *in vitro* de seis fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*, patógeno del cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duchesne ex Rozier) en Costa Rica

Marialicia Vega López

Tesis para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de Licenciada en Agronomía



María del Milagro Granados Montero, Ph. D.

Directora de Tesis



Mauricio Serrano Porras, Ph. D.

Miembro del Tribunal



María Viñas Meneses, Ph. D.

Miembro del Tribunal



Óscar Castro Zúñiga, MSc.

Miembro del Tribunal



Luis Gómez Alpizar, Ph. D.

Director de Escuela



Marialicia Vega López

Sustentante

Dedicatoria

Para Alice,

Mira, lo logramos.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, María del Milagro Granados, Ph. D., a quien le tengo gran admiración y respeto, gracias por la motivación, la paciencia y la confianza, no solo durante el desarrollo de la tesis, sino a lo largo de todos estos años. Todas sus enseñanzas, son parte de la profesional que soy hoy.

A mi comité asesor, Mauricio Serrano, Ph. D., María Viñas Ph. D., y Óscar Castro, MSc. por sus increíbles aportes durante la elaboración del proyecto y la redacción del documento.

A mami, porque su valentía me impulsó a seguir pese a cada obstáculo. Gracias por nunca dejar de creer en mí. Te amo.

A Gabriela Chinchilla, por su disposición para colaborar en todo momento. No sabes cuánto te lo agradezco.

A mis amigos, Juan Diego, Verónica, Paula, Mariana y Stephanie, gracias por ser mi soporte durante este largo proceso. Los quiero más que al chocolate.

A don Marcos Salas y José Daniel Quirós, quienes depositaron en mí la confianza para culminar con esta etapa académica. Al equipo de compras, por sus palabras de aliento.

A todos los que de alguna manera me brindaron su apoyo, gracias infinitas.

Tabla de contenidos

Autorización de tesis.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Lista de Cuadros.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	vii
1. Introducción	14
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivos específicos	
3. Revisión de literatura.....	18
3.1 Aspectos generales del cultivo de fresa	18
3.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	19
3.3 Modos de acción y resistencia a fungicidas	20
3.4 Selección de dosis en pruebas de eficacia de fungicidas a nivel <i>in vitro</i>	23
3.5 Uso de fungicidas para el combate de <i>Fusarium oxysporum</i>	25
4. Metodología	28
5. 4.1 Localización y material experimental	28
4.2 Diseño experimental	29
4.3 Prueba de eficacia de fungicidas para inhibir el crecimiento del micelio	32
4.3.1 Producción de inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i>	32
4.3.2 Cultivo del micelio de <i>Fusarium oxysporum</i> con fungicida	32
4.3.3 Evaluación del crecimiento micelial	33
6. 4.4 Prueba de eficacia de fungicidas sobre la inhibición de la germinación de conidios	34

4.4.1 Producción de conidios de <i>Fusarium oxysporum</i>	34
4.4.2 Exposición de los conidios de <i>Fusarium oxysporum</i> a los fungicidas en estudio.....	35
4.4.3 Evaluación de la germinación de conidios	36
4.5 Análisis estadístico	36
5. Resultados	37
6. Discusión	47
7. Conclusiones	54
8. Recomendaciones	54
9. Financiamiento	55
10. Referencias bibliográficas	55
11. Anexos	74

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Especies de *Fusarium oxysporum*, ingredientes activos, sitio de acción, cultivos hospederos y países donde se realizaron pruebas de eficacia de fungicidas a nivel in vitro.

Cuadro 2. Localidad, provincia, tipo de necrosis y órgano de la planta de fresa, donde se recuperaron aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schlttdl. sensu lato.

Cuadro 3. Descripción de tratamientos (T) para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) y el porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schlttdl. sensu lato recuperados de plantas de fresa. Además de un testigo (Te) sin fungicida.

Cuadro 4. Ingrediente activo (i.a.), dosis mínima comercial y dilución según tratamiento (ppm) para prueba de inhibición del crecimiento del micelio.

Cuadro 5. Ingrediente activo (i.a.), dosis mínima comercial recomendada y dilución según tratamiento (ppm) para prueba de inhibición de la germinación de conidios.

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo fenológico del cultivo de fresa. Adaptado de ITSC (2018) y Rodríguez (2017).

Figura 2. Diseño experimental planteado para prueba de eficacia de fungicidas en concentraciones $x/100$, $x/50$, $x/10$ y x para inhibir A. el crecimiento del micelio y B. la germinación de conidios de aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* obtenidos de plantas de fresa. Además de un testigo (Te) sin fungicida. Nota: x =dosis mínima comercial.

Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* ($n=100$), cultivados in vitro con uno de los siguientes ingredientes activos: benomyl, folpet, iprodione, metil tiofanato y pyraclostrobina + boscalid en concentraciones $x/100$, $x/50$, $x/10$ y x . Las letras diferentes corresponden a los tratamientos que no presentaron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Nota: x =dosis mínima comercial.

Figura 4. Crecimiento del micelio de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*, cultivados in vitro en medio PDA con fungicidas de ingrediente activo benomyl, folpet, iprodione, metil tiofanato y pyraclostrobina + boscalid; en concentraciones $x/100$, $x/50$, $x/10$ y x . Además de un testigo (Te) sin fungicida. Nota: x = dosis mínima comercial.

Figura 5. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo benomyl. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio del aislamiento F285. Nota: x = dosis mínima comercial.

Figura 6. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo folpet. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los cinco aislamientos. Nota: x= dosis mínima comercial.

Figura 7. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo iprodione. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los cinco aislamientos. Nota: x= dosis mínima comercial.

Figura 8. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo metil tiofanato. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio del aislamiento F285. **C.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los aislamientos F2, F297 y F352. Nota: x= dosis mínima comercial.

Figura 9. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo pyraclostrobina + boscalid. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los aislamientos F2, F239, F285 y F297. **C y D.** Crecimiento del micelio del aislamiento F352 de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*. Nota: x= dosis mínima comercial y Rep.= repetición.

Figura 10. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* (n=100), cultivados in vitro con uno de los siguientes ingredientes activos: iprodione, pyraclostrobina + boscalid y thiram, en concentraciones x/100, x/50, x/10 y x. Además, un testigo (Te) sin fungicida. Las letras diferentes corresponden a los tratamientos que no presentaron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Nota: x= dosis mínima comercial.

Figura 11. A. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo iprodione. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F285. **C.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F352. Nota: x= dosis mínima comercial.

Figura 12. A. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo pyraclostrobina + boscalid. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F297. Nota: x= dosis mínima comercial.

Figura 13. A. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo thiram. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F285. Nota: x= dosis mínima comercial.

Lista de Abreviaturas

Adenosín trifosfato	ATP
Potato dextrose agar (Agar papa dextrosa)	PDA
Analysis of Variance (Análisis de Varianza)	
ANOVA	
Asociación de Profesionales en Enfermedades de las Plantas	APEP
Centre for Agricultural Bioscience International	CABI
Centésima parte de la dosis mínima comercial	x/100
Centígrados	°C
Centímetro	cm
Concentración Efectiva Media	CE ₅₀
Crecimiento del micelio del testigo	CTe
Crecimiento del micelio del tratamiento	CTr
Cuadros principales	CP
Dosis mínima comercial	x
Décima parte de la dosis mínima comercial	x/10
Food and Agriculture Organization of United Nations	FAO
Forma especial	f. sp.
Fungicide Resistance Action Committee	FRAC
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Fof
Ingrediente activo	i.a.
Instituto Tecnológico Superior de Coalcomán	ITSC
Internal Transcribed Spacer (Espaciador Interno Transcrito)	ITS
Kilogramo	kg
Mililitro	ml
Milímetro	mm
Ministerio de Agricultura y Ganadería	MAG
Partes por millón	ppm

Porcentaje de germinación de conidios	PGC
Porcentaje de inhibición de la germinación de conidios	PIGC
Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio	PICM
Quincuagésima parte de la dosis mínima comercial	x/50
Quinone outside inhibitor (Inhibidor externos de quinona)	Qols
Servicio Fitosanitario del Estado	SFE
Sistema Nacional de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria	SNITTA
Succinate dehydrogenase inhibitor (Inhibidor de la succinato deshidrogenasa)	SDHIs
Synthetic Nutrient-poor Agar	SNA
Testigo	Te
Toneladas por hectárea	t ha ⁻¹
Tratamiento	T

Resumen

En la última década, los productores de fresa de Llano Grande, Cartago, Costa Rica, han observado una incidencia de plantas marchitas cercana al 35%. Uno de los patógenos que causa esta sintomatología es *Fusarium oxysporum*, conocido por ocasionar hasta 60% de pérdida del cultivo y tener alta distribución a nivel mundial. A nivel nacional, las moléculas más utilizadas por los productores para el control general de enfermedades son benomyl, carbendazina, folpet, iprodione, metil tiofanato y thiram, así como el fungicida compuesto por pyraclostrobina + boscalid, pese a que este y el benomyl no se encuentren registrados para el cultivo. Debido a esto, surge la necesidad de determinar la eficacia biológica de estos fungicidas, para el manejo de *Fusarium oxysporum* y comprobar el efecto de los ingredientes activos sobre la inhibición en el crecimiento del micelio y la germinación de conidios, ya que a nivel nacional no hay estudios publicados. En este estudio se usaron cinco aislamientos del hongo, para cada uno de ellos, se realizaron dos pruebas (inhibición en el crecimiento del micelio e inhibición en la germinación de conidios), según el modo de acción de la molécula. La eficacia de cada fungicida se evaluó en cuatro concentraciones: la dosis mínima comercial (x), la décima parte de la dosis mínima comercial (x/10), la quincuagésima parte de la dosis mínima comercial (x/50) y la centésima parte de la dosis mínima comercial (x/100). Los cinco fungicidas evaluados presentaron una inhibición del crecimiento del micelio en la dosis mínima comercial de un 96.28 % de inhibición para benomyl, 73.00 % para folpet, 54.98 % para iprodione, 88.00 % para metil tiofanato y 51.67 % para pyraclostrobina + boscalid. En el caso del porcentaje de la germinación de conidios obtenido en la dosis mínima comercial fue de 78.52 % para iprodione, 0.75 % para pyraclostrobina + boscalid y 0.00 % para thiram, sin embargo, estos dos últimos no presentaron diferencias significativas. Se determinó que los fungicidas benomyl, metil tiofanato y thiram mostraron alta eficacia *in vitro* sobre *F. oxysporum* Schltdl. *sensu lato*.

1. Introducción

En Costa Rica existen 342 fincas dedicadas al cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duchesne ex Rozier), ubicadas en Llano Grande de Cartago (132 fincas), Poás y Fraijanes en Alajuela (74 fincas), Los Santos en San José (71 fincas), Varablanca en Heredia (56 fincas) y Puntarenas (9 fincas) (Sistema Nacional de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria [SNITTA], 2020). El rendimiento nacional promedio se estima en 50 t ha⁻¹, con un rendimiento por planta que oscila entre 0.8 y 1.2 kg por ciclo (J. Cruz, comunicación personal, 19 febrero de 2021).

La fresa es un cultivo susceptible al ataque de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia* DC., *Fusarium* Link., *Verticillium* Nees., *Pythium* Nees. y *Phytophthora* Bary, así como las especies *Botrytis cinerea* Pers., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Mycosphaerella fragariae* (Tul. & C. Tul.) Lindau, *Phoma exigua* Desm., *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *C. fragariae* Brooks, y *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz., *Ilyonectria destructans* (Zinssm.) Rossman, L. Lombard & Crous y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Weber & Hahn, 2019; Mariscal et al., 2017; Sánchez et al., 2016; Maas, 2014; Cano, 2013; Koike et al., 2012; Miller et al., 2012; Baino et al., 2011; Fang et al., 2011).

En la última década, productores en Estados Unidos de América (California), México y Costa Rica, han observado la aparición de síntomas asociados a marchitez de plantas de fresa (Zúñiga, 2020; Mariscal et al., 2017; Gordon et al., 2016; Koike et al., 2009). En Costa Rica, como consecuencia de la enfermedad, se estimó para el año 2020 una reducción en la cantidad de plantas del 35 % en Llano Grande (M. Zúñiga, comunicación personal, 8 febrero de 2021) y entre 10-12 % en la zona de Poás y Fraijanes (W. Villegas, comunicación personal, 8 febrero de 2021). Entre el 2014 y 2017, se recolectaron muestras con síntomas de marchitez en estas zonas y se encontró la presencia de los hongos *F. oxysporum*, *I. destructans*, *M. phaseolina*, *Verticillium dahliae*

Nees., *Neopestalotiopsis clavispora* (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous. (SNITTA, 2020), por lo que, posiblemente varios hongos ocasionan esta sintomatología.

La marchitez por *Fusarium* ha ocasionado pérdidas de hasta el 60 % del cultivo de fresa (Golzar et al., 2007), y el patógeno *Fusarium oxysporum* Schltdl posee una alta capacidad de infección y distribución a nivel mundial (Shabani et al., 2014). En el cultivo de fresa se presenta la forma especial (f. sp.) *fragariae* descrita en 1962 en Australia (Winks & Williams, 1965).

Los síntomas de la marchitez por *Fusarium* en el cultivo de fresa incluyen: reducción del crecimiento, marchitez, necrosis en la corona y raíces, así como la eventual muerte de la planta (Pastrana et al., 2018; Henry et al., 2016; Koike et al., 2015; Fang et al., 2012).

A nivel mundial, el manejo del patógeno se realiza principalmente con la aplicación de fungicidas (Everts et al., 2014; Amini & Sidovich, 2010). Los grupos químicos acilalaninas, benzimidazoles, benzonitrilos, azoles, ditiocarbamatos y estrobirulinas, han presentado inhibición sobre *Fusarium* spp., al ser evaluados mediante pruebas de eficacia *in vitro* (Pérez et al., 2020; Albuquerque et al., 2018; Cruz et al., 2018; Parra et al., 2011; Mamza et al., 2010).

Otras alternativas de combate son el uso de biocontroladores (Chen et al., 2020; de Lamo & Takken, 2020; Luo et al., 2019), compuestos de origen vegetal como aceites esenciales (Cerna et al., 2019; Park et al., 2017; Terzi et al., 2007) y solarización del suelo o sustrato (Pérez-Hernández et al., 2017; Bennett, 2012; Matheron & Porchas, 2010). Asimismo, se han creado variedades de fresa resistentes a *F. oxysporum*, a través de la inclusión de genes que aportan resistencia (Pincot et al., 2018; Borrero et al., 2017).

En Costa Rica, para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa se encuentran registrados 50 productos comerciales (catorce ingredientes activos y una

mezcla) (Servicio Fitosanitario del Estado [SFE], 2021). Sin embargo, la mayoría de los productos están registrados para el manejo de *B. cinerea* y *A. alternata*. Los ingredientes activos benomyl, carbendazina, folpet, iprodione, metil tiofanato y thiram, así como el fungicida compuesto por pyraclostrobina + boscalid, son los más usados por los productores actualmente (M. Zúñiga, comunicación personal, 7 mayo de 2020); sin embargo, este último y el benomyl no se encuentran registrados para ser utilizados en el cultivo de fresa.

Debido a la falta de estudios a nivel nacional, surge la necesidad de determinar la eficacia biológica de seis fungicidas, utilizados por los productores en el cultivo de fresa para el manejo de *Fusarium oxysporum*, y comprobar el efecto de los ingredientes activos sobre la inhibición en el crecimiento del micelio y la germinación de conidios.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar la eficacia biológica *in vitro* de seis fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*, patógeno asociado al cultivo de fresa en Costa Rica.

2.2 Objetivos específicos

1. Conocer la eficacia *in vitro* de cinco fungicidas, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*.
2. Conocer la eficacia *in vitro* de tres fungicidas sobre la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*.
3. Definir el efecto de cuatro dosis para cada fungicida sobre el crecimiento del micelio y la germinación de conidios.

3. Revisión de literatura

3.1 Aspectos generales del cultivo de fresa

Del género *Fragaria* se han reportado 21 especies (Catalogue of life, 2021). La fresa comercial (*Fragaria x ananassa* Duchesne ex Rozier) es un híbrido entre especies americanas: *F. virginiana* y *F. chiloensis* (Hancock, 1999), el cual domina el mercado por características como su sabor, tamaño y propiedades organolépticas (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2021). Esta se cultiva alrededor del mundo, desde el ártico a los trópicos (Avitia et al., 2014) y en el 2018 se produjeron 8 337 099 de toneladas a nivel mundial, con América del Norte y Asia como los mayores productores (Food and Agriculture Organization of United Nations [FAO], 2021)

El ciclo de producción del cultivo comprende aproximadamente 150 días desde el trasplante a la cosecha y se divide en tres etapas fenológicas: vegetativa, reproductiva y productiva (Instituto Tecnológico Superior de Coahuila de Zaragoza [ITSC], 2018; Rodríguez, 2017) (Figura 1).

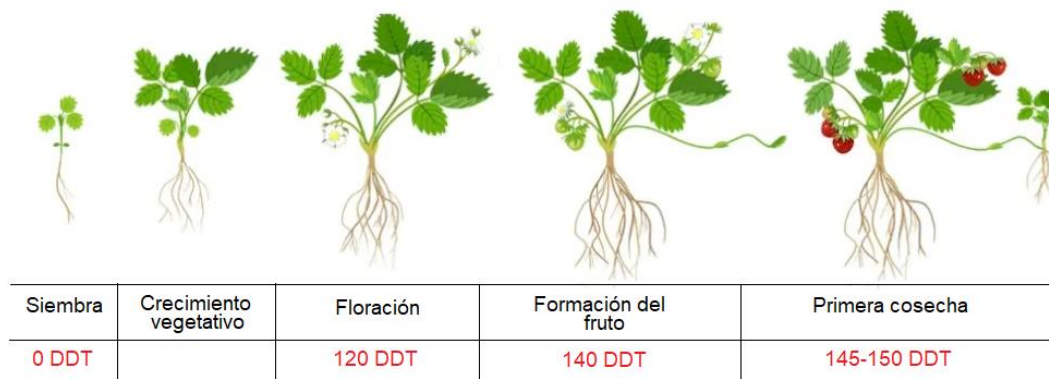


Figura 1. Ciclo fenológico del cultivo de fresa. Adaptado de ITSC (2018) y Rodríguez (2017).

Entre las variedades de fresa existentes, el cultivar Festival es uno de los más utilizados a nivel nacional; esta variedad reporta un rendimiento promedio de 50 t ha⁻¹,

ya que cada planta produce entre 0.8 y 1.2 kg por ciclo (J. Cruz, comunicación personal, 19 febrero de 2021). Es una planta vigorosa producto del cruce entre Rosa Linda (aportó las características de alto rendimiento y forma cónica del fruto) x Oso Grande (por su capacidad de producir frutos grandes y firmes) realizado por la Universidad de Florida (Chandler et al., 2000). Es resistente a *Phytophthora cactorum* y *Botrytis cinerea* (MAG et al., 2017) y susceptible a *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Xanthomonas fragariae* (Chandler et al., 2000).

3.2 *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* tiene una amplia distribución en Costa Rica y el mundo (Centre for Agricultural Bioscience International [CABI], 2021; Granados-Montero et al., 2018) y es de gran importancia desde el punto de vista agrícola y económico, debido a que tiene alta capacidad de ocasionar pérdidas en distintos cultivos (Torres, 2000).

Fusarium cuenta con especies saprófitas y patogénicas (Torres, 2000). Este presenta dos estados: el estado anamorfo (asexual) y el estado teleomorfo (sexual), pero es habitual encontrarlo en el primero. En cuanto a formas de reproducción, se puede desarrollar una hifa a partir de la germinación de los macroconidios y microconidios (Gordon, 2017), o por medio de clamidosporas, estructuras de resistencia que permiten al patógeno adaptarse y sobrevivir en el suelo por largos periodos en ausencia del hospedero (Payner et al., 2014) lo que dificulta el manejo. Una vez germinada, la hifa crece hasta formar un micelio, luego se producen estructuras llamadas conidióforos o esporodocios y, a partir de ellos, se desarrollan nuevos conidios (Ma et al., 2013).

Con respecto a su morfología, el hongo produce un micelio aéreo blanco que se torna púrpura después de una semana en el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) (Rentería et al., 2019), forma macroconidios hialinos, con dos o tres septos, de forma alargada y ligeramente curvada, el tamaño de los conidios varía entre 16.90 μm – 31.60 μm de largo y 3.89 μm – 5.53 μm de ancho y el pie basal termina

en punta. Los microconidios son hialinos, no tienen septos y son de forma ovalada con longitud entre 8.70 μm – 14.05 μm y 3.30 μm – 5.00 μm de ancho, tienen monofálides cortas y alta presencia de clamidosporas intercalares o terminales (García et al., 2020; Ashwathi et al., 2017; Suga et al., 2013).

Existen más de 100 formas especiales conocidas para *F. oxysporum*, de amplia distribución mundial (Gordon, 2017). Por su parte, el Index Fungorum (2021) reportó 129 formas especiales de la especie. En el cultivo de fresa se presenta *F. oxysporum* f. sp. *Fragariae* (Fof) descrita por primera vez en 1962 en Australia (Winks & Williams, 1965). A nivel mundial, la marchitez por Fusarium es considerada la principal enfermedad que afecta al cultivo (Payner et al., 2014). Este patógeno se desarrolla a una temperatura entre 25-30°C, un pH entre 3.5-7 y 12 horas de oscuridad (Cruz et al., 2019; Ávalos & Estrada., 2010; Sharma et al., 2005).

F. oxysporum reside en el suelo y provoca una enfermedad vascular porque se transporta vía xilema, ingresa por las raíces hacia la corona de la fresa y ocasiona un bloqueo del sistema vascular de la planta, lo que impide la absorción de agua y asimilados y favorece el desarrollo de necrosis (oscurecimiento del tejido vascular y cortical de la planta). Dentro de los síntomas causados en el cultivo de fresa se presentan: retraso en el crecimiento, marchitez de la parte aérea que comienza en las hojas viejas y asciende hacia las hojas nuevas, coloración de la corona anaranjada o café, necrosis en las raíces, reducción de la cantidad de frutos, los cuales son factores que producen un colapso y posterior muerte de la planta (Pastrana et al., 2018; Pastrana et al., 2017; Henry et al., 2016; Koike et al., 2015; Juber et al., 2014 Fang et al., 2012; Koike et al., 2009).

3.3 Modos de acción y resistencia a fungicidas

Los fungicidas son agrupados según el proceso metabólico que se inhibe en el organismo, más conocido como modo de acción (Yang et al., 2011). Actualmente, existen doce modos de acción representados por las letras A, B, C, D, E, F, G, H, I, M, U, P.

Estos se subdividen según el sitio de acción (lugar en el cual el fungicida ejerce el efecto sobre el hongo), por ejemplo, B1, C2, C3, G1, entre otros. Asimismo, los sitios de acción se clasifican de acuerdo al grupo químico y finalmente se diferencia entre ingredientes activos (Fungicide Resistance Action Committee [FRAC], 2021).

Los benzimidazoles (B1) son fungicidas sistémicos que interrumpen la polimerización de la β -tubulina e inhiben la mitosis, por ende, interfieren en el crecimiento del micelio del hongo (Kara et al., 2020). Los azoles (G1), formado por los grupos químicos piperazinas, piridinas, pirimidinas, imidazoles, triazoles y triazolintiones, también inhiben el crecimiento del micelio del hongo (FRAC, 2021). Su modo de acción es interferir la enzima C-14 demetilasa, requerida para la síntesis de ergosterol, el cual es un componente de las membranas (Rekanović et al., 2010; Klix et al., 2007). El grupo químico triazol es el más utilizado en el manejo de *Fusarium* spp. a nivel mundial (Cendoya et al., 2020; Hellin et al., 2018; Willyerd et al., 2012).

Las carboxamidas (C2) y estrobirulinas (C3) son fungicidas sistémicos que interrumpen la cadena respiratoria de la mitocondria, se reduce la síntesis de ATP y se detiene la producción de energía, lo que causa la muerte del hongo antes de germinar (FRAC, 2021; Yan et al., 2019; Xia et al., 2017). Por su parte, las dicarboximidas (E3), son fungicidas con traslocación translaminar que inhiben el crecimiento y la germinación de esporas, ya que afectan los procesos de respiración y síntesis de proteínas estructurales (Baibakova et al., 2016; Tanaka & Izumitsu, 2010).

Los ditiocarbamatos son fungicidas protectores de contacto y cuentan con un modo de acción multisitio (M) (Lovato et al., 2017). Este grupo puede actuar tanto en la inhibición del crecimiento del micelio como en la germinación de esporas, en ese sentido, thiram, ferbam y ziram afectan el transporte entre membranas y enzimas deshidrogenasas involucradas en la respiración, mientras que zineb, maneb, metiram y mancozeb, influyen directamente en el crecimiento de las células (Dias, 2012). Al igual

que los ditiocarbamatos, las ftalamidas, tienen un modo de acción M y el ingrediente activo folpet inhibe el crecimiento (Kushwahaa & Kaushik, 2016; Siegel, 1971).

Independientemente del modo de acción, el uso prolongado de fungicidas causa resistencia del hongo a un ingrediente activo específico (Carmona & Sautua, 2017), es decir, existe selección de los individuos resistentes de la población al estar expuestos a una molécula de manera recurrente, lo que ocasiona la pérdida de eficacia en el control (Hobbelen et al., 2014). El grupo químico se clasifica según los niveles de riesgo a resistencia como: alto, medio-alto, medio, medio-bajo y bajo (FRAC, 2021). Las especies de *Fusarium* tienden a desarrollar rápidamente resistencia a las estrobirulinas, mientras que tienen mayor sensibilidad a los azoles (Patón et al., 2016; Pasquali et al., 2013; Butkutė et al., 2008).

Los grupos químicos con un sitio específico de acción se consideran de alto riesgo a producir resistencia, como es el caso de los benzimidazoles, que producen mutaciones en el gen de la β -tubulina (Ghosal et al., 2020; Fisher & Dewdney, 2013) y las estrobirulinas, que pueden ocasionar mutaciones del gen *CYTb* e inducir a una respiración alternativa (Heick et al., 2017; Köller et al., 2002). Las carboxamidas también tienen un solo sitio de acción, sin embargo, pueden generar resistencia media-alta, por lo que no se recomienda su uso individualmente (Hou et al., 2017). Otro grupo con riesgo medio-alto son las dicarboximidas, ya que, en ensayos de laboratorio, poblaciones de *Botrytis cinerea* extraídas de plantas de uva, se volvieron resistentes entre 2 y 10 años después de la aplicación intensiva del producto (Brent & Hollomon, 2007).

Los azoles producen mutaciones en diferentes sitios, alteran la secuencia de aminoácidos en la proteína codificada por el gen *CYP51* y causan sobreexpresión de transportadores de salida (CaCDR1, CaCDR2 y CaMDR1) o mutaciones en *ERG3* que alteran la vía del ergosterol, por lo que fueron clasificados con riesgo de resistencia media (Wachowska et al., 2018; Parker et al., 2014). Los ditiocarbamatos y ftalamidas muy

raramente han presentado resistencia, incluso después de muchos años de uso, por lo que se clasificaron con riesgo de resistencia baja (FRAC, 2021; Brent & Hollomon, 2007).

3.4 Selección de dosis en pruebas de eficacia de fungicidas a nivel *in vitro*

Cuando se realizan pruebas de eficacia de fungicidas *in vitro*, las dosis utilizadas generalmente se presentan en partes por millón (ppm) (o su equivalente $\mu\text{g ml}^{-1}$), esta concentración se calcula con base en el porcentaje del ingrediente activo (i.a.) en el producto comercial (Karkee & Mandal, 2020). El uso de diferentes concentraciones de un fungicida para determinar el potencial inhibitorio de una molécula sobre un patógeno permite el cálculo de la CE_{50} (Concentración Efectiva Media) (Liang et al., 2014).

Para determinar la CE_{50} , se debe realizar una transformación logarítmica (base 10) de los valores de inhibición de cada concentración de fungicida (Liang et al., 2014) y, por medio de una regresión lineal, se obtiene la cantidad de partes por millón (ppm) de CE_{50} , es decir, el punto donde la molécula ejerce una reducción de crecimiento del 50 % sobre el organismo (Chen et al., 2013). Otra forma de calcular el valor de CE_{50} es mediante el uso de una regresión logística a partir de los datos sin transformar, y con el punto de inflexión de la curva se obtiene el valor de ppm que produce 50 % de inhibición del crecimiento (Ritz et al., 2015). Con el fin de determinar este valor, la literatura reporta la selección de las concentraciones de manera logarítmica (2000, 1000, 100, 10, 1, 0,5, 0,1, 0,01 y 0,001 ppm (Álvarez-Medina et al., 2017; Espinoza et al., 2017).

Algunas investigaciones mencionan que a partir del producto comercial se establecen tres dosis (alta, media y baja). Por ejemplo, Majchrowicz & Poprawski (1993), establecieron la dosis recomendada para uso en el campo (x), 10 veces la dosis recomendada (10x) y la décima parte de la dosis recomendada (x/10) para una prueba de inhibición en el crecimiento del micelio de hongos entomopatógenos [*Beauveria bassiana* (Bals. -Criv.) Vuill. 1912, *Conidiobolus coronatus* (Costantin) A. Batko 1964, *C. thromboides* Drechsler 1953, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokín 1883,

Paecilomyces farinosus (Holmsk.) AHS Br. & G. Sm. 1957, *P. fumosoroseus* (Wize) AHS Br. & G. Sm. 1957, *Scopulariopsis brevicaulis* Bainier 1907 y *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas 1939]. En un estudio sobre el manejo de *Colletotrichum*, Gaviria et al. (2013) seleccionaron la dosis comercial del producto (x), la mitad de esta ($\frac{1}{2}$ x), y la dosis comercial más la mitad de la misma ($x + \frac{1}{2}$ x). Adicionalmente, Guillén et al. (2017), evaluaron siete fungicidas sobre la inhibición de *Colletotrichum acutatum* en la dosis recomendada (x), el doble de la dosis (2x) y la mitad de la dosis ($\frac{1}{2}$ x).

En una investigación se probaron las dosis recomendadas (100 %) de seis fungicidas comerciales para el manejo de *Hymenoscyphus pseudoalbidus* Queloz, Grünig, Berndt, T. Kowalski, TN Sieber y Holdenr. 2011; a partir de estas, se realizaron diluciones del 85, 65, 50, 35, 15, 5, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 %, además de un testigo sin fungicida (Dal Maso et al., 2014). Esta metodología también fue utilizada por Marcellin et al. (2018), al evaluar seis productos sobre el desarrollo de *Phytophthora megakarya* Brasier y MJ Griffin 1979, en cinco concentraciones (100, 10, 0.1, 0.01 y 0 % de la dosis de campo recomendada).

En *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. 1881, se evaluaron ocho fungicidas en concentraciones de 500, 1000, 2000 y 2500 ppm (Padvi et al., 2018) y para *F. oxysporum* f.sp. *lentis* WL Gordon 1965 utilizaron dosis de 50, 100, 150 y 200 ppm (Kumari et al., 2020). Por otro lado, para determinar la eficacia de fungicidas en el manejo de *Thecaphora frezii* Carranza & JC Lindq. 1962, causante de la pudrición carbonosa del maní, se propusieron doce fungicidas en cinco concentraciones 0.01, 0.10, 1.00, 10.00, y 100.00 ppm, más un testigo sin fungicida (Paredes et al., 2021).

De igual manera, se ha establecido la dosis según la movilidad que tenga el fungicida (sistémico o de contacto) en la planta (Baibakova et al., 2016). Pruebas de eficacia sobre *F. oxysporum* f. sp. *Ciceri* usaron seis fungicidas sistémicos en concentraciones de 250, 500 y 1000 ppm y seis fungicidas de contacto a 1000, 1500 y 2000 ppm (Sahane et al., 2021). Para el mismo patógeno, Bashir et al. (2017) utilizaron

cinco fungicidas sistémicos en concentraciones 50, 100, 200, 400 y 500 ppm y cinco fungicidas de contacto en concentraciones 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm.

3.5 Uso de fungicidas para el combate de *Fusarium oxysporum*

Alrededor del mundo se han probado moléculas a nivel *in vitro* para combatir la marchitez por *Fusarium* en distintos cultivos (Cuadro 1). En ese sentido, Cho y Moon (1985) demostraron que el benomyl produjo 100 % de inhibición en dosis mayores a 1×10^5 ppm tanto para el crecimiento del micelio como en la germinación de esporas; mientras que Rajput et al. (2006), determinaron que la carbendazina y el metil tiofanato inhibieron el crecimiento del micelio a partir de los 500 ppm y, conforme aumentó la dosis del ingrediente activo (1000 y 1500 ppm), se mostró una reducción en el diámetro de la colonia. Yossen & Conles (2014), reportaron que, tanto la carbendazina como el metil tiofanato (1.60 ppm cada uno) y el tiabendazol (4.0 ppm) ocasionaron 99 % de inhibición en el crecimiento del micelio.

Pruebas *in vitro* para determinar la eficacia de fungicidas sobre la inhibición del crecimiento de micelio de *F. oxysporum*, demostraron que las moléculas procloraz y bromuconazol (ambos G1) produjeron 96 % de inhibición, seguidos por benomyl y carbendazina (ambos B1) con un 95 % de inhibición (Amini & Sidovich, 2010). Con el uso de tebuconazol (G1), carboxin (C2) + thiram (M) y carbendazina (B1) + mancozeb (M), se obtuvo un 100 % de inhibición del crecimiento del micelio, mientras que con metil tiofanato y carbendazina (ambos B1) se generó un 89 % de inhibición (Magar et al., 2020).

A nivel nacional, se ha realizado poca investigación sobre pruebas de eficacia *in vitro* de fungicidas para *F. oxysporum* y los resultados de la misma se encuentran en tesis de licenciatura, al evaluar aislamientos procedentes de zonas piñeras, por ejemplo, Vásquez (2009) mencionó que carbendazina, metil tiofanato y spiroxamina presentaron 100 % en la reducción del crecimiento del micelio, la pyraclostrobina 75 % y el difenconazol 60 %. Asimismo, Hidalgo (2019) reportó que carbendazina, epoxiconazol y

propiconazol, inhibieron el 100 % de crecimiento del micelio al usar la dosis comercial. No se encontraron estudios a nivel nacional relacionados al manejo químico de *F. oxysporum* u otros fitopatógenos asociados al cultivo de fresa.

Cuadro 1. Especies de *Fusarium oxysporum*, ingredientes activos, sitio de acción, cultivos hospederos y países donde se realizaron pruebas de eficacia de fungicidas a nivel *in vitro*.

Especie	Ingrediente activo	Sitio de acción	Cultivo	País	Referencia
<i>F. oxysporum</i>	carbendazina epoxiconazol, propiconazol	B1 G1	Piña	Costa Rica	Hidalgo (2019)
<i>F. oxysporum</i>	carbendazina,tiabendazol, metil tiofanato tebuconazol mancozeb	B1 G1 M	Orégano	Argentina	Yossen & Conles (2014)
<i>F. oxysporum</i>	carbendazina, metil tiofanato bitertanol,difenconazol,triadimenol spiroxamine	B1 G1 G2	Piña	Costa Rica	Vásquez (2009)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceri</i>	carbendazina, metil tiofanato carboxin azoxystrobina tebuconazol captan, thiram, mancozeb	B1 C2 C3 G1 M	Garbanzo	India	Magar et al. (2020)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	benomyl, metil tiofanato iprodione captan	B1 E3 M	Fresa	Korea	Cho & Moon (1985)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	benomyl, carbendazina bromuconazol,azoxystrobina fludioxonil procloraz, fludioxonil	B1 C3 E2 G1	Tomate	Irán	Amini & Sidovich (2010)
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	metil tiofanato boscalid pyraclostrobina fludioxonil difenconazol, procloraz	B1 C2 C3 E2 G1	Tomate	Grecia	Malandrakis et al. (2018)
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	carbendazina, metil tiofanato azufre mancozeb	B1 Inorgánico M	Algodón	Pakistán	Rajput et al. (2006)

4. Metodología

4.1 Localización y material experimental

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno y el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos (CIPROC), ambos de la Universidad de Costa Rica, entre mayo de 2021 y octubre de 2022. Se usaron cinco aislamientos de *Fusarium* (códigos F2, F239, F285, F297 y F352), provenientes del proyecto de investigación 810-B7-A16 “Análisis sistémico de la muerte de plantas de fresa [*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.] en las principales zonas productoras de Costa Rica y determinación preliminar de la patogenicidad de los hongos asociados” (Cuadro 2). Estos aislamientos se identificaron mediante secuenciación del ITS (imprimadores ITS4 e ITS5) como *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* y se encontraban almacenados en celulosa a 4 °C.

Cuadro 2. Localidad, provincia, tipo de necrosis y órgano de la planta de fresa, donde se recuperaron aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*.

Localidad	Provincia	Tipo de necrosis	Órgano	Aislamiento
Llano Grande	Cartago	Ascendente	Raíz	F2
Llano Grande	Cartago	Descendente	Raíz	F239
Llano Grande	Cartago	Descendente	Pecíolo	F285
Llano Grande	Cartago	Ascendente	Raíz	F297
Varablanca	Heredia	Ascendente	Raíz	F352

4.2 Diseño experimental

Se realizó un experimento para determinar la inhibición en el crecimiento del micelio y otro experimento para determinar la inhibición en la germinación de conidios, empleando las moléculas más utilizadas por los productores nacionales para el control de enfermedades en fresa. Los fungicidas con ingrediente activo benomyl, folpet, iprodione, metil tiofanato y pyraclostrobina + boscalid, se utilizaron para evaluar la inhibición del crecimiento del micelio (Figura 2.A), mientras que iprodione, pyraclostrobina + boscalid y thiram, para la inhibición en la germinación de conidios (Figura 2.B). Los fungicidas iprodione y pyraclostrobina + boscalid, afectan tanto el crecimiento del micelio como la germinación de conidios (Anexo 1). El ingrediente activo carbendazina se había considerado dentro de los productos a utilizar, sin embargo, fue descartado durante el desarrollo del proyecto, ya que el producto comercial registrado en el país para el cultivo de fresa, fue discontinuado.

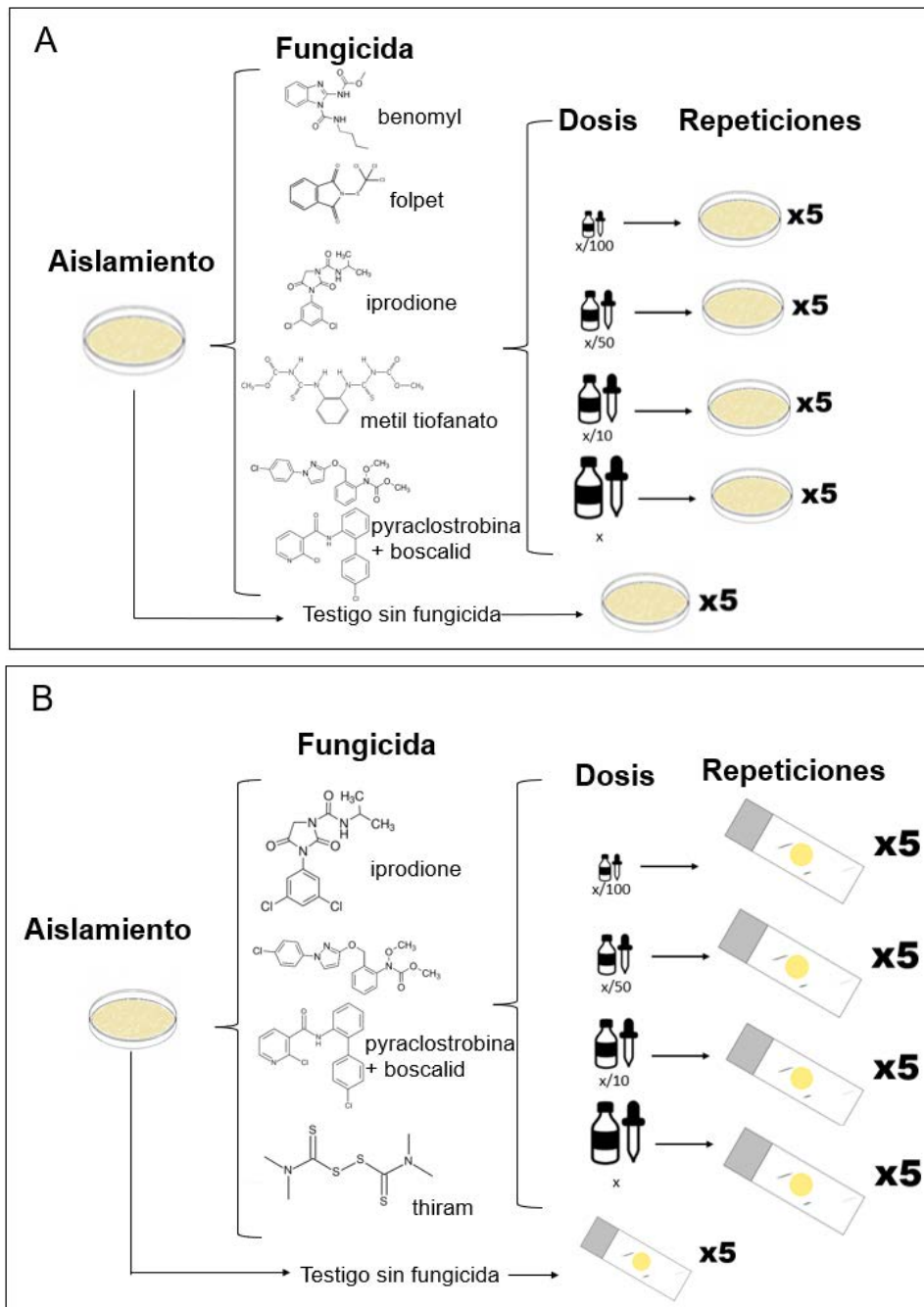


Figura 2. Diseño experimental planteado para prueba de eficacia de fungicidas en concentraciones $x/100$, $x/50$, $x/10$ y x para inhibir **A.** el crecimiento del micelio y **B.** la germinación de conidios de aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schldl. *sensu lato* obtenidos de plantas de fresa. Además de un testigo (Te) sin fungicida. Nota: x =dosis mínima comercial.

En el Cuadro 3 se presenta la distribución de los 32 tratamientos (20 tratamientos para la prueba de inhibición del crecimiento del micelio y 12 tratamientos para la prueba de inhibición en la germinación de conidios). Cada fungicida se aplicó en cuatro concentraciones: la dosis mínima comercial (x), la décima parte de la dosis mínima comercial (x/10), la quincuagésima parte de la dosis mínima comercial (x/50) y la centésima parte de la dosis mínima comercial (x/100), con base en lo propuesto por Majchrowicz y Poprawski (1993), Dal Maso et al. (2014) y Marcelli et al. (2018). Además, se contó con un testigo sin fungicida. Los tratamientos fueron dispuestos bajo un diseño irrestricto al azar. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Los fungicidas utilizados se describen en el anexo I.

Cuadro 3. Descripción de tratamientos (T) para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) y el porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* recuperados de plantas de fresa. Además de un testigo (Te) sin fungicida.

Prueba para evaluar el PICM					Prueba para evaluar el PGC		
benomyl	folpet	iprodione	metil tiofanato	pyraclostrobina + boscalid	iprodione	pyraclostrobina + boscalid	thiram
CM T1	CM T5	CM T9	CM T13	CM T17	GC T1	GC T5	GC T9
CM T2	CM T6	CM T10	CM T14	CM T18	GC T2	GC T6	GC T10
CM T3	CM T7	CM T11	CM T15	CM T19	GC T3	GC T7	GC T11
CM T4	CM T8	CM T12	CM T16	CM T20	GC T4	GC T8	GC T12

Dosis	x/100	x/50	x/10	x
--------------	-------	------	------	---

Nota: CM= crecimiento del micelio, GC= germinación de conidios, T= tratamiento, x/100= la centésima parte de la dosis mínima comercial, x/50= la quincuagésima parte de la dosis mínima comercial, x/10= la décima parte de la dosis mínima comercial, x= dosis mínima comercial.

4.3 Prueba de eficacia de fungicidas para inhibir el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* Schltdl. sensu lato, patógeno del cultivo de fresa.

4.3.1 Producción de inóculo de *Fusarium oxysporum*

Para la producción del inóculo, se tomó un disco de celulosa (5 mm) con crecimiento micelial de cada uno de los aislamientos seleccionados. Cada disco se colocó en un plato Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) al 25 %. Se incubó a 25 °C ± 1 °C en la oscuridad, durante 14 días (Leslie & Summerell, 2006). Luego de este periodo, se realizó el proceso de multiplicación, el cual consistió en tomar una porción del micelio más joven (el más cercano a la punta de las hifas) y colocarlo en un plato Petri con medio de cultivo PDA. Por cada aislamiento se pusieron a crecer cinco platos.

4.3.2 Cultivo del micelio de *Fusarium oxysporum* con fungicida

Con el fin de evaluar el efecto de los fungicidas sobre el crecimiento del micelio del hongo en estudio, se utilizó la metodología propuesta por Dhingra & Sinclair (1985). Esta consiste en colocar un disco de 5 mm de diámetro de medio de cultivo con el micelio del patógeno de 14 días (obtenidos en la etapa de multiplicación del punto 4.3.1), en el centro de un plato Petri con 20 ml de medio PDA, más la dosis de fungicida y evaluar según el tratamiento (Cuadro 4). Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C ± 1 °C en la oscuridad, durante 14 días (Leslie & Summerell, 2006). La descripción de los tratamientos se encuentra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Ingrediente activo (i.a.), dosis mínima comercial y dilución según tratamiento (ppm) para prueba de inhibición del crecimiento del micelio.

i.a.	Dosis mínima comercial	Dosis aplicada (ppm) de i.a.			
		x	x/10	x/50	x/100
benomyl	0.2 kg/ 200 L de agua	500	50	10	5
folpet	210 ml/100 L de agua	1.01	0.10	0.02	0.01
iprodione	1.5 L/400 L de agua	1.88	0.19	0.04	0.02
metil tiofanato	0.75 L/400 L de agua	0.94	0.10	0.02	0.01
pyraclostrobina + boscalid	1 g/L de agua	0.38	0.04	0.01	0.004

Nota: x/100= la centésima parte de la dosis mínima comercial, x/50= la quincuagésima parte de la dosis mínima comercial, x/10= la décima parte de la dosis mínima comercial, x= dosis mínima comercial.

4.3.3 Evaluación del crecimiento micelial

La medición del crecimiento micelial se realizó en el momento en que el testigo cubrió el 100 % del plato Petri (aproximadamente 14 días). Con una regla, se midió el diámetro mayor (horizontalmente) y menor (verticalmente) de cada colonia (cm) y se promediaron los datos para obtener el crecimiento del hongo. Con los datos de crecimiento obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio (PICM) de acuerdo con la dosis de fungicida utilizado (Albuquerque et al., 2018; Castellanos et al., 2015), mediante la fórmula:

$$PICM = \frac{CTe - CT}{CTe} * 100$$

Donde, CTe= crecimiento del micelio del testigo y CT= crecimiento del micelio del tratamiento.

4.4 Prueba de eficacia de fungicidas sobre la inhibición de la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum* Schldl. sensu lato, patógeno del cultivo de fresa.

4.4.1 Producción de conidios de *Fusarium oxysporum*

Para la producción de conidios del hongo, se tomó un disco de celulosa (5 mm) con crecimiento micelial de cada uno de los aislamientos seleccionados. Cada disco se colocó en un plato Petri con medio de cultivo Agar-Agua + clavel estéril. Este medio se utilizó, ya que favorece la producción conidios consistentes en tamaño o forma (Leslie & Summerell, 2006). Los discos se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad, durante 14 días.

Después de 14 días, a cada plato Petri se añadió 10 ml de agua destilada estéril y con un asa estéril se raspó suavemente la superficie del medio de cultivo para remover los conidios presentes y obtener una suspensión. Esta se vertió en un envase de vidrio de 50 ml previamente desinfectado, se añadió una gota de Tween al 80 % y se agitó en un vortex por 10 s.

A partir de este volumen, se ajustó la concentración promedio de conidios a $\geq 1 \times 10^5$ conidios ml^{-1} (Do et al., 2019; Argomedo et al., 2015, Alaniz et al., 2011), para ello se realizó el conteo de los conidios presentes con un hematocímetro, el cual consiste en una lámina de cristal del tamaño de un portaobjetos de mayor grosor, cuenta con ranuras en forma de H, con canales a cada lado que sostienen un cubreobjetos grueso especial a una distancia de 0.1 mm por encima de las dos porciones interiores de la H, formando dos cámaras entre ellas y el cubreobjetos. En estos canales se colocó, con ayuda de una aguja de 2 ml, dos gotas de la suspensión conidial, por medio de fuerza capilar la suspensión cubre las dos cámaras. Cada cámara cuenta con un rayado "Neubauer" de 9 mm^2 dividido en nueve cuadros principales (CP) de 1 mm por lado. De los nueve cuadros, se utilizaron las cuatro esquinas y el centro, en cada uno se contó y reportó la cantidad de conidios presentes.

Se utilizó el cálculo de la concentración de conidios ml⁻¹ descrito por French & Hebbert, (1982):

$$\text{Suma de 5 cuadros} \times 2000 = \text{conidios/ml}$$

Para calcular el volumen final necesario para llevar la suspensión conidial a la concentración deseada (1×10⁵ conidios ml⁻¹) se utilizó la fórmula:

$$\frac{\text{Conidios obtenidos/ml}}{\text{Conidios deseados/ml}} \times \text{Volumen total original (ml)} = \text{Volumen final (ml)}$$

4.4.2 Exposición de los conidios de *Fusarium oxysporum* a los fungicidas en estudio.

Con el fin de exponer los conidios del hongo a los fungicidas en estudio, se utilizó la metodología propuesta por Do et al. (2019), Park et al. (2017) y Hong et al. (2015), la cual consiste en mezclar el volumen final (ml) de la suspensión de conidios obtenido en el punto 4.4.1 y adicionar la cantidad necesaria de fungicida para alcanzar la concentración requerida en cada tratamiento. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 µl de la suspensión conidial + el fungicida y se depositó en un portaobjetos estéril con un disco (5 mm) de medio PDA (Masiello et al., 2019). Todos los tratamientos se incubaron a 25 °C ± 1 °C en la oscuridad. Los tratamientos se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Ingrediente activo (i.a.), dosis mínima comercial recomendada y dilución según tratamiento (ppm) para prueba de inhibición de la germinación de conidios.

i.a.	Dosis mínima comercial	Dosis aplicada (ppm) de i.a.			
		x	x/10	x/50	x/100
Iprodione	1.5 L/400 L de agua	1875.0	187.5	37.5	19.0
pyraclostrobina + boscalid	1 g/L de agua	380	38	7.6	3.8
Thiram	2 kg/400 L de agua	4000	400	80	40

Nota: x/100= la centésima parte de la dosis mínima comercial, x/50= la quincuagésima parte de la dosis mínima comercial, x/10= la décima parte de la dosis mínima comercial, x= dosis mínima comercial.

4.4.3 Evaluación de la germinación de conidios *Fusarium oxysporum*

Para evaluar la germinación de conidios de *Fusarium oxysporum*, se realizó un conteo de conidios germinados. Luego de 10 horas de incubación, se seleccionaron 100 conidios al azar (ajuste del microscopio a 40 X), se contó cuántos de ellos germinaron (Do et al. 2019; Masiello et al., 2019). Finalmente, se calculó el porcentaje de germinación de conidios (PGC) (Nisa et al., 2011), mediante la fórmula:

$$PGC = \frac{\text{Conidios germinadas}}{\text{Conidios totales}} * 100$$

4.5 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó por medio del software R (R Core Team, 2020). Se promediaron los datos de las mediciones de cada cepa. Se realizó una comparación de medias entre fungicidas por cada dosis y una prueba Tukey ($p < 0,05$) para determinar diferencias entre tratamientos. Previamente, se analizaron los supuestos de normalidad mediante prueba Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas mediante prueba Levene. Asimismo, para cada fungicida se ajustó un modelo de regresión logística que incluyera las cuatro dosis utilizadas para determinar la CE_{50} utilizando el paquete drc (Ritz et al. 2015). La función drm del paquete drc utiliza por defecto un modelo logístico de cuatro parámetros (Ritz et al. 2015), que corresponde a la función:

$$f(x, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{(1 + \exp(b(\log(x) - \log(e))))}$$

Donde, f representa la función del PICM o PGC, a partir de x=dosis (ppm) de fungicida, y los parámetros b= pendiente, c= 0 %, d=100 % y e= punto de inflexión (CE_{50}). Se generó una función para cada fungicida y se calculó la CE_{50} a partir del parámetro “e”, dados los parámetros “c” y “d”. Para algunos casos, fue necesario ajustar el parámetro “c” a valores distintos de 0 para conseguir la convergencia del modelo.

5. Resultados

En las figuras 3 y 4 se presentan los resultados de la inhibición del crecimiento del micelio (%) de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*, al comparar el promedio de los aislamientos F2, F239, F285, F297 y F352, cultivados en medio PDA con fungicidas de ingrediente activo benomyl, metil tiofanato, folpet, iprodione y pyraclostrobina +boscalid, en concentraciones x/100, x/50, x/10 y x. El fungicida benomyl inhibió más del 95 % en las cuatro dosis utilizadas entre las que no se encontraron diferencias significativas. Para el fungicida folpet la dosis mínima comercial inhibió el 73 % del crecimiento del micelio y esta fue significativamente diferente de las otras dosis evaluadas, las cuales mostraron porcentajes de inhibición menores al 30 %. En el caso del metil tiofanato se obtuvo una inhibición mayor al 80 % en las concentraciones x/50, x/10 y x, mientras que la dosis x/100 fue menor (70 %), sin embargo, no se presentaron diferencias entre las cuatro dosis. Por su parte, el iprodione, los porcentajes de inhibición fueron levemente superiores al 50 % y no se encontraron diferencias significativas entre dosis. En el caso de la pyraclostrobina + boscalid, la dosis x inhibió el 52 % del crecimiento del micelio, en comparación al 20% de la dosis x/100.

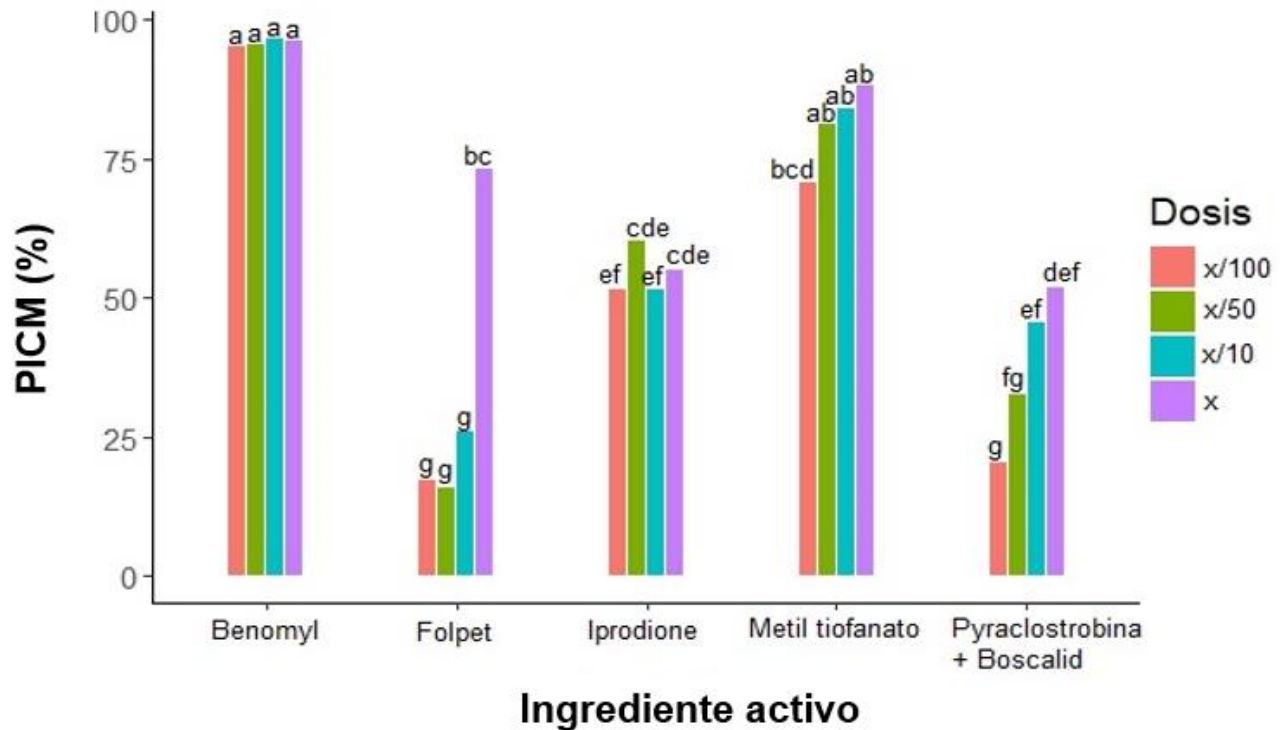


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato* (n=100), cultivados *in vitro* con uno de los siguientes ingredientes activos: benomyl, folpet, iprodione, metil tiofanato y pyraclostrobina + boscalid en concentraciones x/100, x/50, x/10 y x. Las letras diferentes corresponden a los tratamientos que no presentaron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Nota: x= dosis mínima comercial.

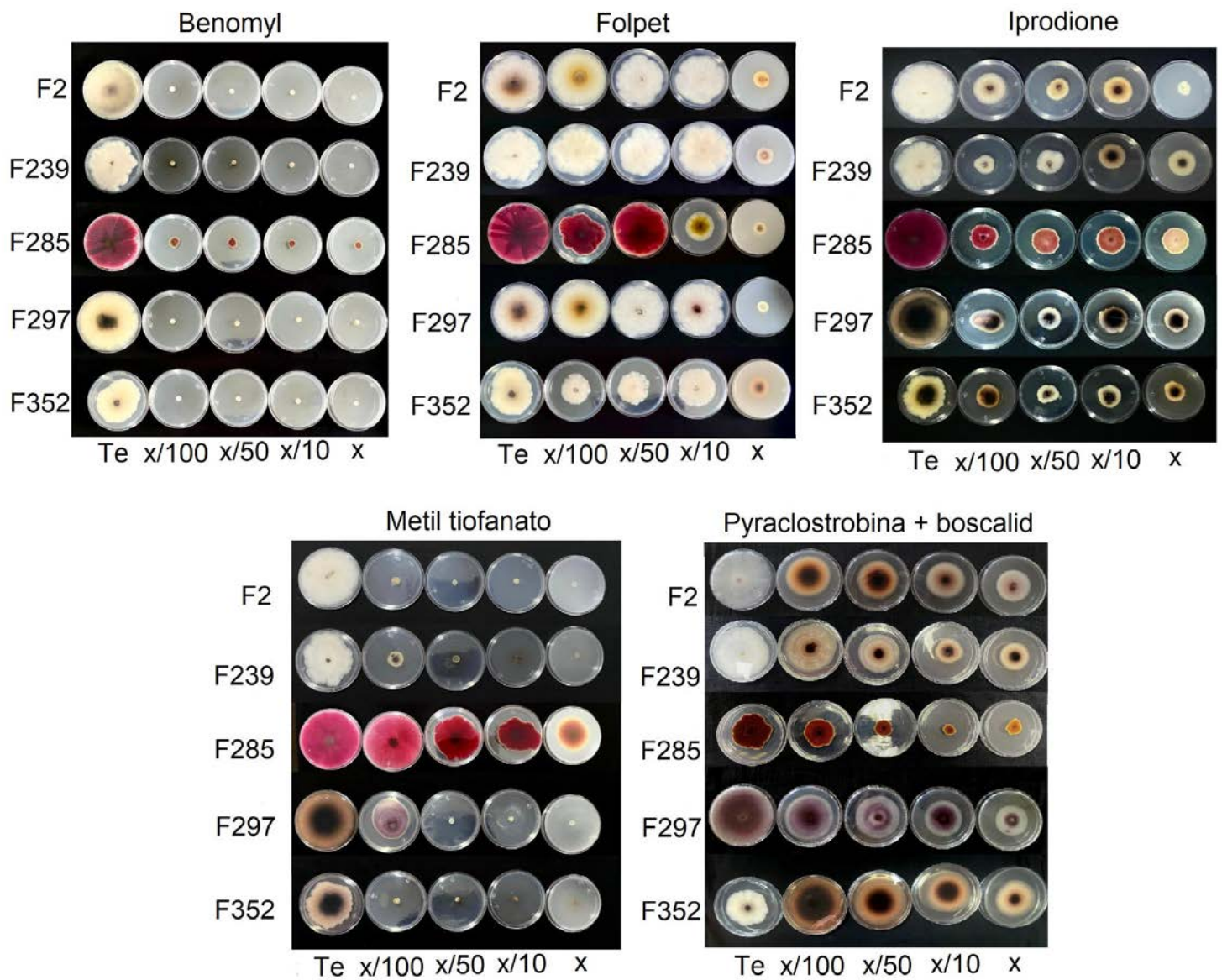


Figura 4. Crecimiento del micelio de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltdl. *sensu lato*, cultivados *in vitro* en medio PDA con fungicidas de ingrediente activo benomyl, folpet, iprodione, metil tiofanato y pyraclostrobina + boscalid; en concentraciones x/100, x/50, x/10 y x. Además de un testigo (Te) sin fungicida. Nota: x= dosis mínima comercial.

Se calculó la Concentración Efectiva Media (CE₅₀) mediante un modelo logístico para determinar el potencial inhibitorio de las moléculas benomyl, folpet, iprodione, metil tiofanato y pyraclostrobina + boscalid (Figuras 5-9) sobre el crecimiento del micelio. En el caso del benomyl, el PICM fue 100 % en todas las cepas, a excepción de la F285 (Figura 5.A); lo que da como resultado una línea recta, la cual no permite ajustar el modelo logístico. Con base en esto, se calculó la CE₅₀ solo para la cepa F285 (Figura 5.B), la cual fue de 0.0000000088 ppm, cantidad de fungicida para obtener el 50% de la inhibición.

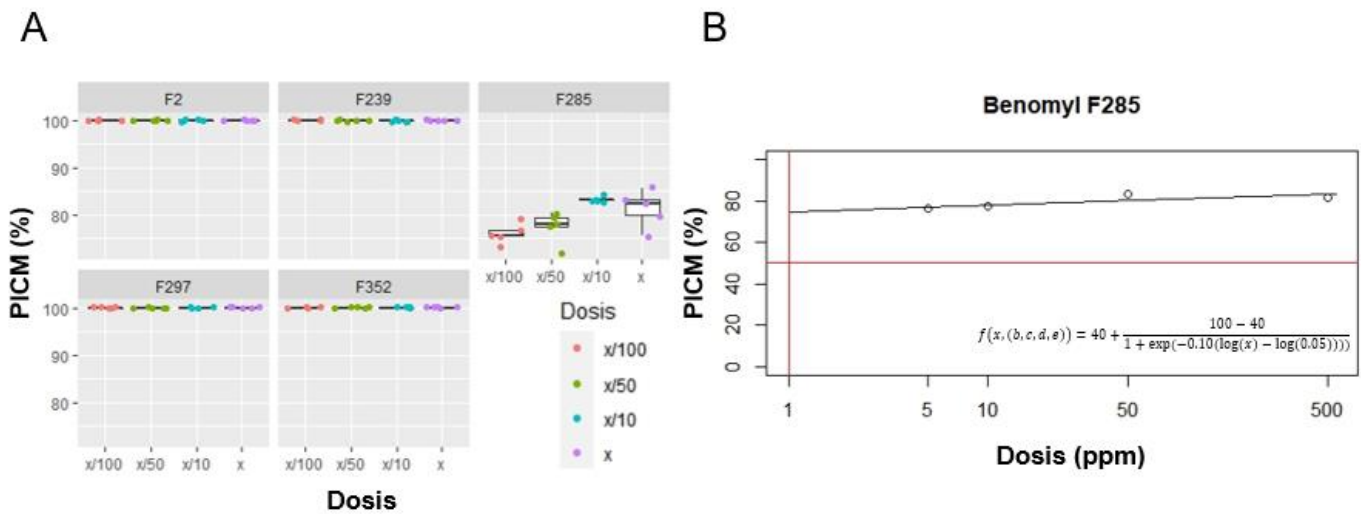


Figura 5. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schldl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo benomyl. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio del aislamiento F285. Nota: x= dosis mínima comercial.

Con el fungicida folpet se requieren 0.29 ppm para inhibir el 50% del crecimiento del micelio (Figura 6), y en el caso del iprodione esto sucede a 0.00025 ppm de fungicida (Figura 7).

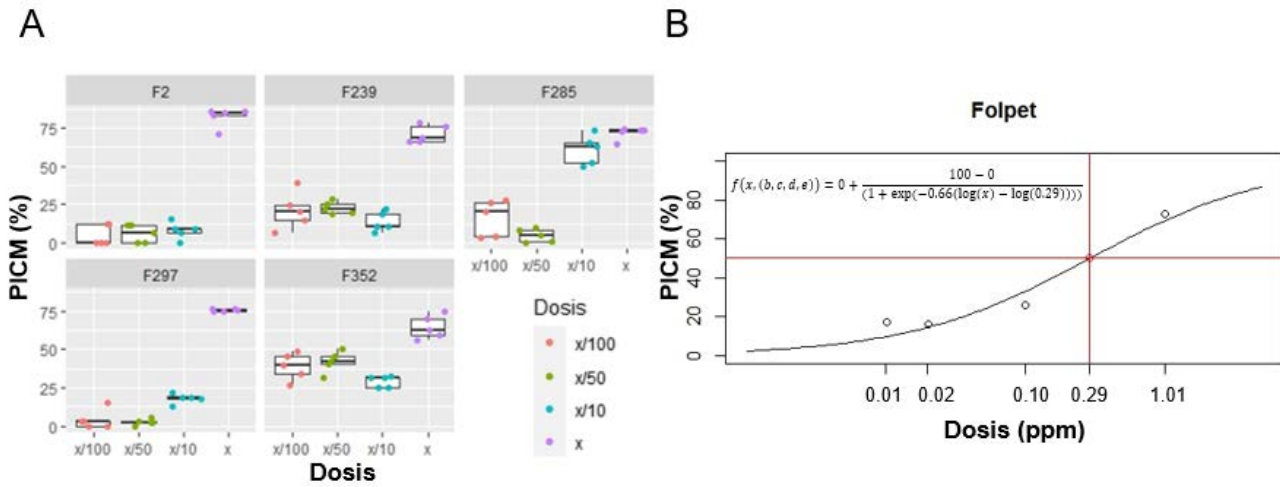


Figura 6. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schldl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo folpet. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los cinco aislamientos. Nota: x= dosis mínima comercial.

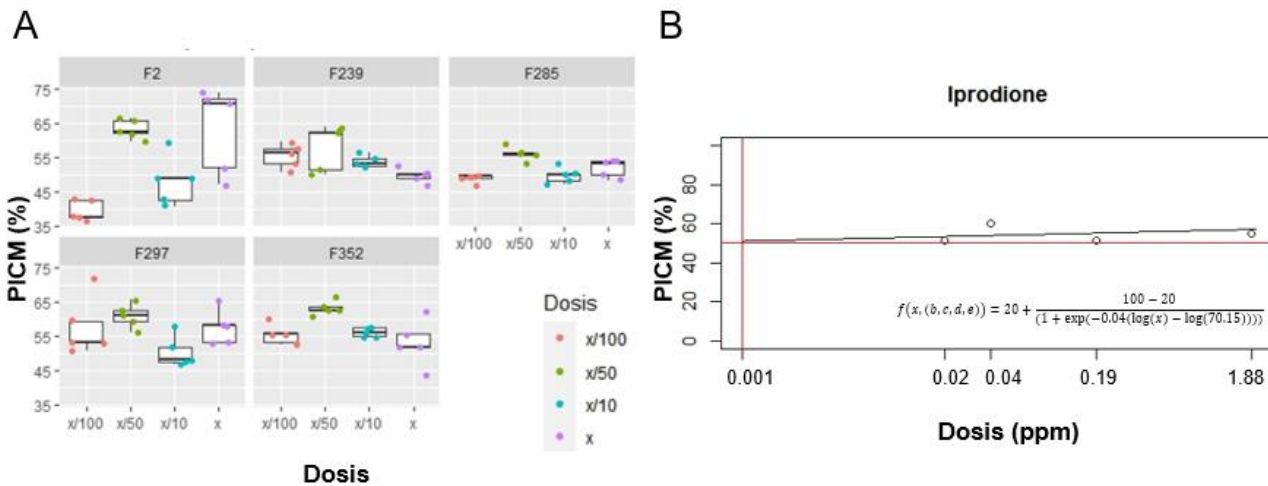


Figura 7. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schldl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo iprodione. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los cinco aislamientos. Nota: x= dosis mínima comercial.

Por su parte, en el cálculo la CE₅₀ de metil tiofanato se presentaron dos fenómenos. Al obtener un 100 % de inhibición en el aislamiento F352 (Figura 8.A), esta se extrajo del modelo logístico. El aislamiento F285, presentó menor sensibilidad al fungicida, es decir, requiere de 1.97 ppm de fungicida (Figura 8.B), en comparación a los aislamientos (F2, F239 y F297) que requieren de 0.00016 ppm de fungicida para obtener el 50% de la inhibición (Figura 8.C).

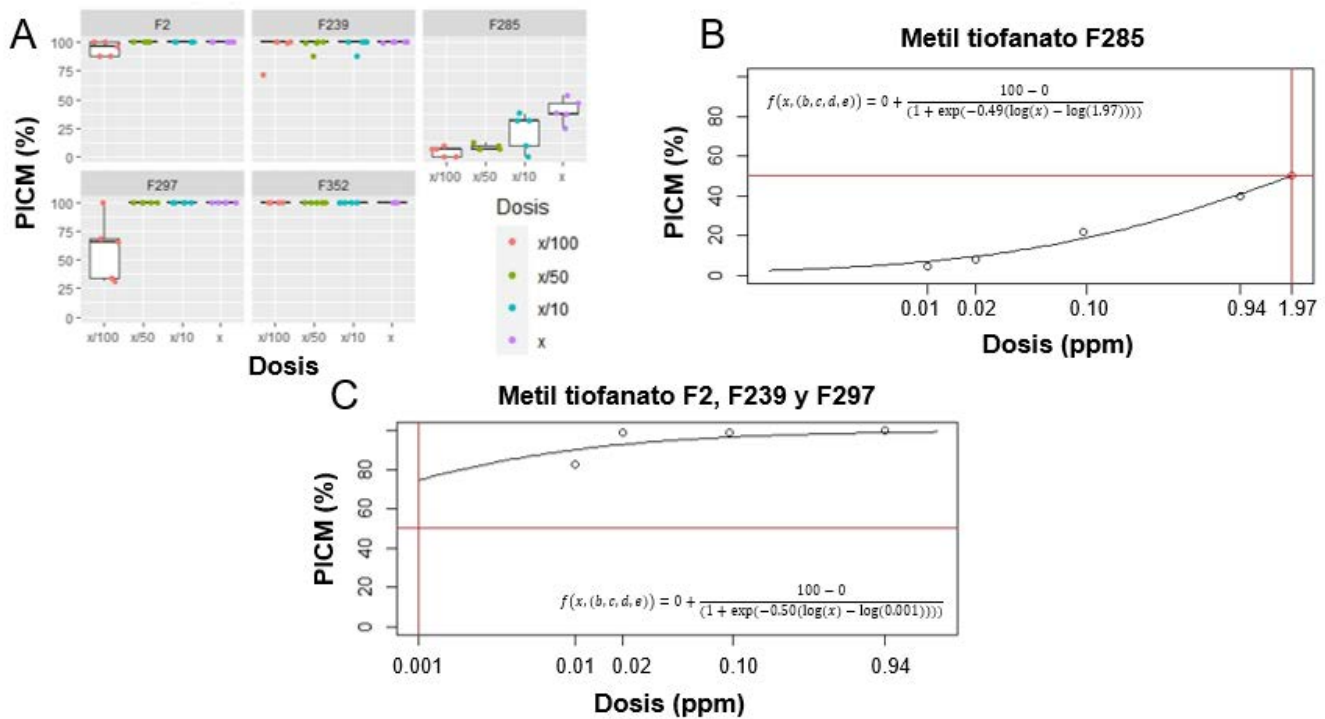


Figura 8. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schldt. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo metil tiofanato. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio del aislamiento F285. **C.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los aislamientos F2, F297 y F352. Nota: x= dosis mínima comercial.

Para el fungicida compuesto por pyraclostrobina + boscalid, se obtuvo una CE₅₀ de 0.186 ppm (Figuras 9.A y 9.B). Dentro de este análisis no se tomó en cuenta el aislamiento F352, ya que presentó un crecimiento del micelio mayor al testigo sin fungicida (Figura 9.C y 9.D).

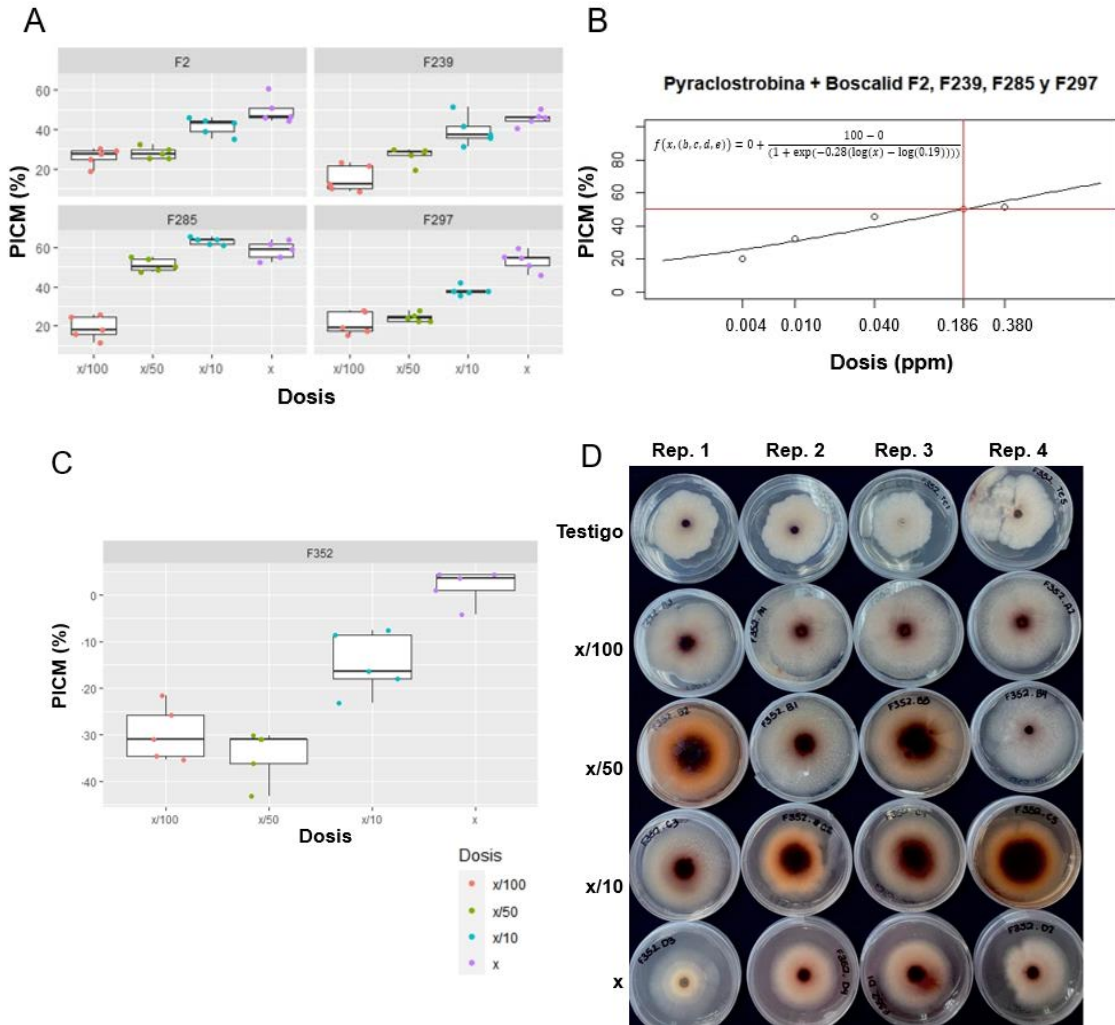


Figura 9. A. Porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (PICM) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo pyraclostrobina + boscalid. B. Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% del crecimiento de micelio de los aislamientos F2, F239, F285 y F297. C y D. Crecimiento del micelio del aislamiento F352 de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato*. Nota: x= dosis mínima comercial y Rep.= repetición.

En la figura 10, se presenta la germinación de conidios (%) de *Fusarium oxysporum* Schltl. *sensu lato*, por los fungicidas con ingrediente activo iprodione, pyraclostrobina + boscalid y thiram en concentraciones x/100, x/50, x/10 y x, así como un testigo sin fungicida. Los conidios expuestos al fungicida de ingrediente activo iprodione, germinaron significativamente más que los conidios con pyraclostrobina + boscalid y thiram. Asimismo, los tres fungicidas presentaron diferencias significativas con respecto al testigo (sin fungicida).

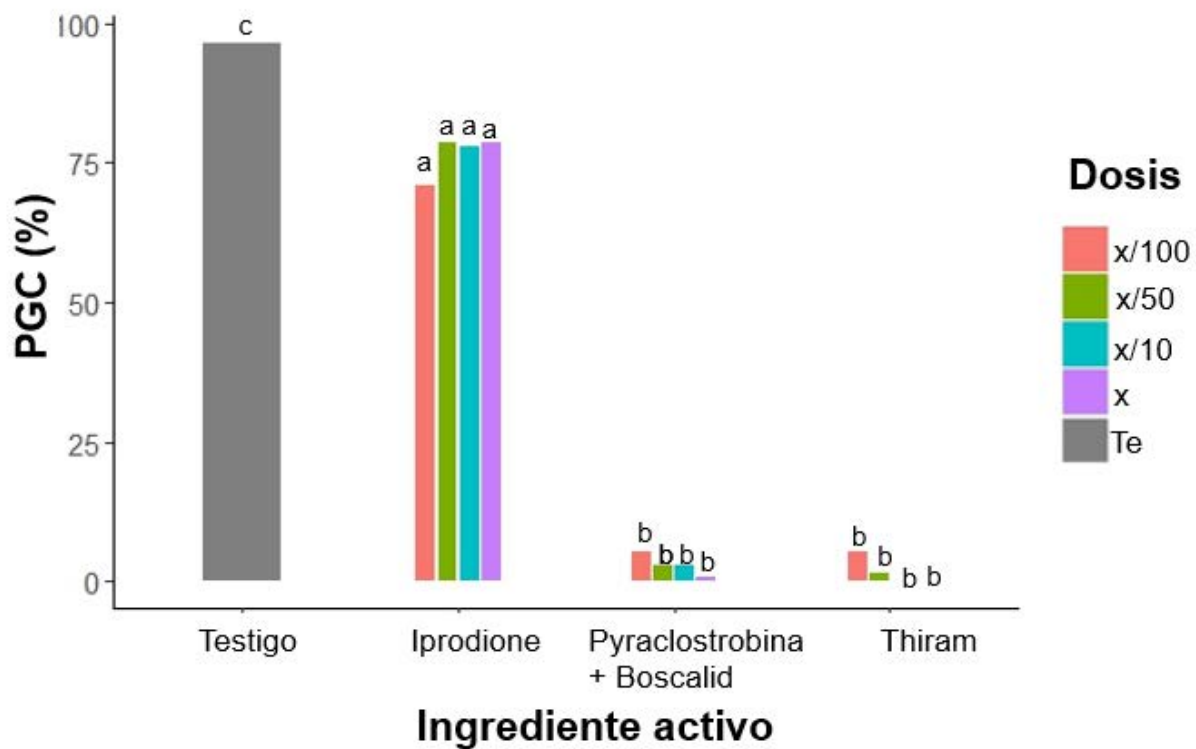


Figura 10. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltl. *sensu lato* (n=100), cultivados *in vitro* con uno de los siguientes ingredientes activos: iprodione, pyraclostrobina + boscalid y thiram, en concentraciones x/100, x/50, x/10 y x. Además, un testigo (Te) sin fungicida. Las letras diferentes corresponden a los tratamientos que no presentaron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$). Nota: x= dosis mínima comercial.

Para realizar el cálculo de la CE₅₀, se utilizó el porcentaje de germinación de conidios (Figuras 11-13). En el caso del iprodione, podemos observar que los aislamientos F2, F239 y F297 no se tomaron en cuenta dentro del análisis porque obtuvieron un 100 % de germinación (F2 y F239) o un 0 % de germinación (F297) (Figura 11.A). A partir del modelo logístico, se determinó que se requieren de 16.4 ppm para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F285, en comparación con los 3800 ppm para inhibir la germinación de conidios del aislamiento F352. Es importante mencionar que por repetición se seleccionaron 100 conidios al azar para F2, F239, F297 y F352 y se contó cuántos de ellos germinaron, en el caso de F285, solo se pudieron contar 20 conidios por baja disponibilidad (Figura 11.B).

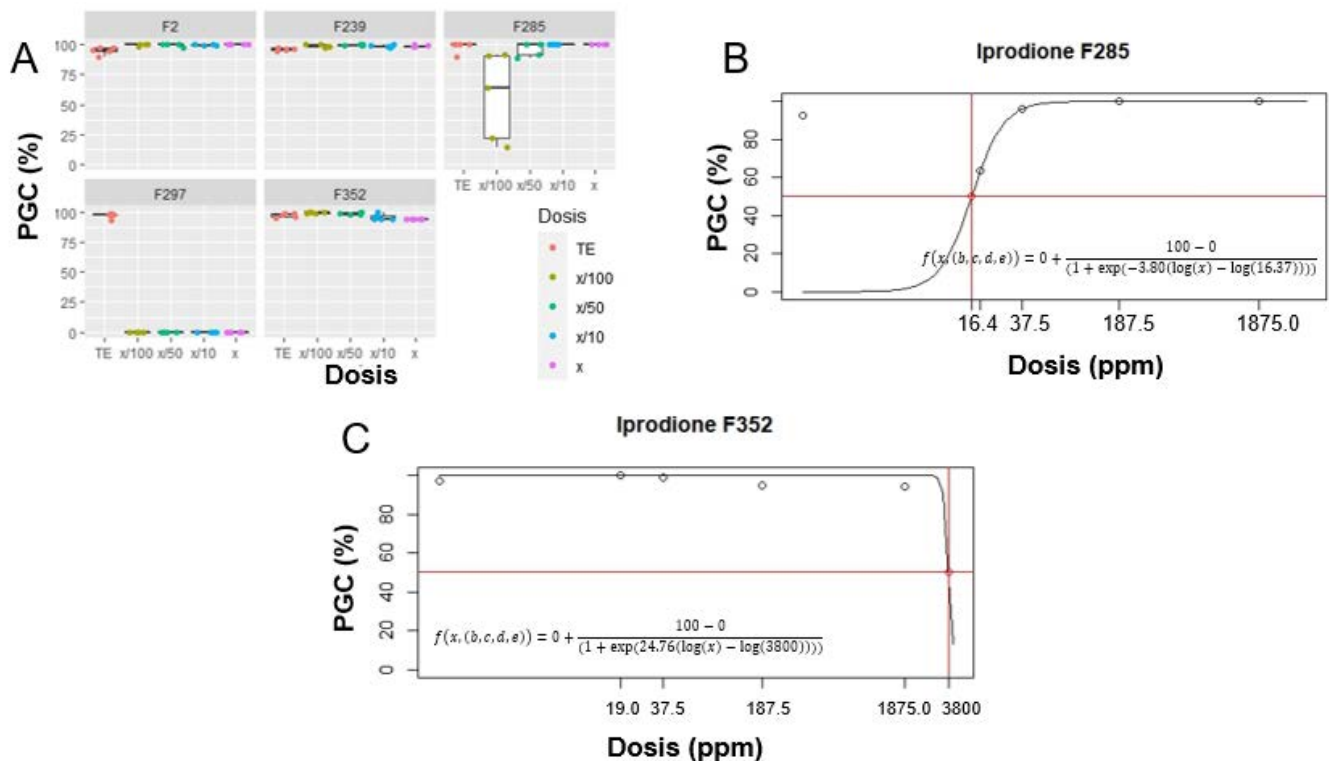


Figura 11. A. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo iprodione. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F285. **C.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F352. Nota: x= dosis mínima comercial.

En el caso del fungicida compuesto por pyraclostrobina + boscalid, solo se pudo calcular la CE₅₀ para el aislamiento F297, con un valor de 2.27 ppm (Figura 12), mientras que para el fungicida con ingrediente activo thiram, se requieren 8 ppm para inhibir el 50 % de la germinación de conidios del aislamiento F285 (Figura 13).

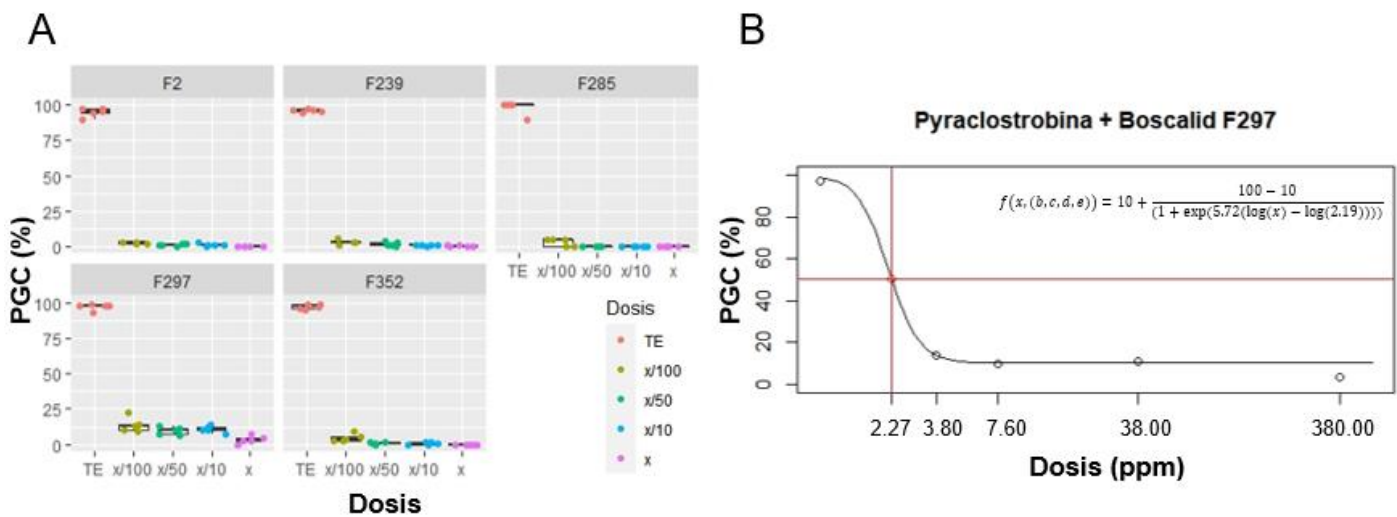


Figura 12. A. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schldl. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo pyraclostrobina + boscalid. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F297. Nota: x= dosis mínima comercial.

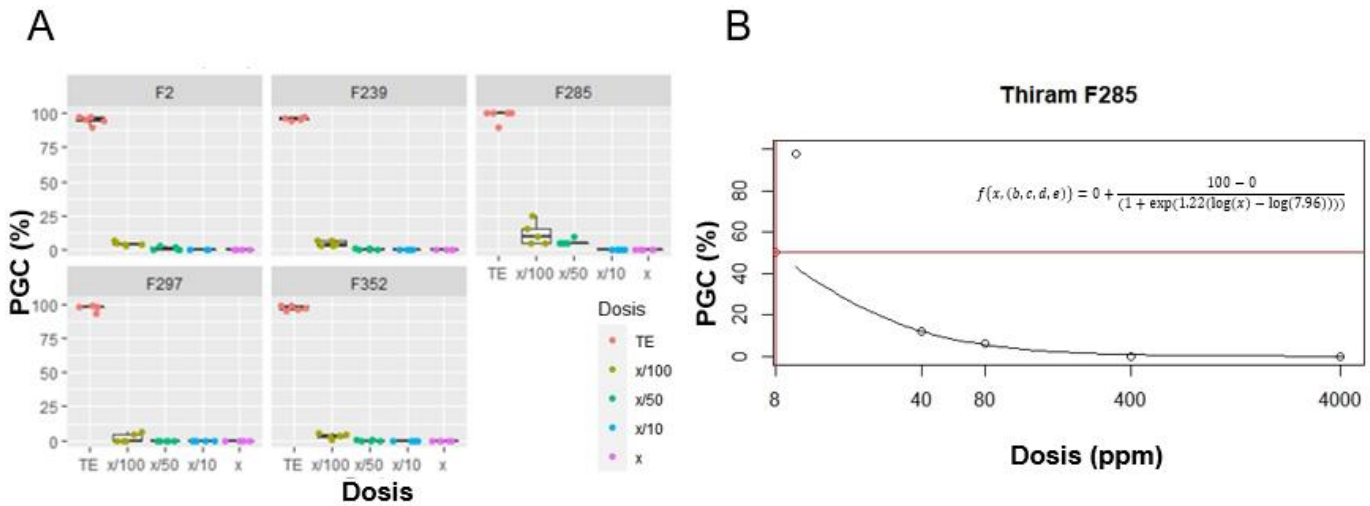


Figura 13. A. Porcentaje de germinación de conidios (PGC) de cinco aislamientos de *Fusarium oxysporum* Schltld. *sensu lato* al exponerlo al fungicida con ingrediente activo thiram. **B.** Modelo logístico para el cálculo de la dosis (ppm) de fungicida requerido para inhibir el 50% de la germinación de conidios del aislamiento F285. Nota: x= dosis mínima comercial.

6. Discusión

Esta investigación contribuye a llenar el vacío de información existente en cuanto a la eficacia de fungicidas para el manejo de *F. oxysporum* Schltld. *sensu lato* en la producción de fresa en Costa Rica. En particular, se determinó que los fungicidas iprodione (para crecimiento del micelio y germinación de conidios) y pyraclostrobina + boscalid (para crecimiento del micelio) presentan baja eficacia *in vitro*, mientras que los fungicidas benomyl, metil tiofanato (para crecimiento del micelio) y thiram (para germinación de conidios) mostraron alta eficacia.

Todas las moléculas presentaron inhibición del crecimiento del micelio de *F. oxysporum* a nivel *in vitro* en las dosis evaluadas (Figura 3). La alta efectividad por parte del benomyl en las cuatro dosis utilizadas (5, 10, 50 y 500 ppm) para los aislamientos F2, F239,

F297 y F352 (Figura 5), concuerda con lo descrito por Yadav y Ansari (2017), donde al evaluar seis fungicidas a nivel *in vitro*, obtuvieron que las moléculas carbendazina, benomyl, metil tiofanato y propiconazol presentaron 100 % de inhibición en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* en las tres dosis utilizadas (250, 500 y 1000 ppm). Bashir et al. (2017) también evaluaron la eficacia *in vitro* de seis fungicidas en tres dosis (300, 500 y 700 ppm) sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, sin embargo, estos autores obtuvieron con el benomyl un 79.8 %, 90.2 % y 93.4 % respectivamente. Rafique et al. (2016) reportan un 90% de inhibición del crecimiento de micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* en prueba *in vitro* a una dosis de 100 ppm.

El benomyl se considera un fungicida con un alto riesgo de generar resistencia a nivel de campo (Fisher et al. 2013), debido a que tiene un único sitio de acción (Ghosal et al., 2020). Estudios recientes han demostrado que las especies *Fusarium asiaticum* (Komura et al., 2018; Duan et al., 2016) y *Fusarium graminearum* (Machado et al., 2017; Sevastos et al., 2017) presentan mutaciones y producen resistencia moderada o alta a los benzimidazoles, grupo al cual pertenece el benomyl.

Los resultados obtenidos muestran una eficacia del 73 % de inhibición del crecimiento del micelio presentada por el folpet en la dosis mínima comercial (1.01 ppm) (Figura 6). Masiello et al. (2019) evaluaron el control de esta molécula a nivel *in vitro* sobre diferentes especies de *Fusarium* y obtuvieron que, en una dosis de 1200 ppm, inhibió un 100 % del crecimiento de *F. graminearum*, sin embargo, en el caso de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* estos presentaron valores de 49 y 82 % respectivamente. El folpet ha sido un fungicida disponible por más de 55 años en el mercado (Gupta, 2018) y estudios demuestran que aplicaciones repetidas de folpet en campo, producen que la actividad microbiana y hongos presentes en el suelo tengan la capacidad para degradar la molécula rápidamente (Martins et al., 2013).

En el presente estudio se observó que el metil tiofanato inhibió en promedio 88 % del crecimiento del micelio en la dosis mínima comercial (0.94 ppm) (Figura 3); según lo descrito

por Maitlo et al. (2014), donde probaron la eficacia del metil tiofanato a nivel *in vitro* en dosis de 1 - 10 000 ppm para el control de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc*) en garbanzo, con eficacia del 66.37 % en concentración de 1 ppm y 90.25 % en concentración de 10 ppm, por tanto, con una concentración similar (~ 1 ppm) se inhibió más el crecimiento de micelio en el presente estudio que lo descrito por los autores. Masiello et al. (2019), al evaluar el metil tiofanato a nivel *in vitro* en concentraciones de 15, 150 y 1500 ppm obtuvieron un 84 % de inhibición del crecimiento del micelio de varias especies de *Fusarium* en la dosis de 15 ppm.

Rekanović et al. (2010), calcularon la CE_{50} del metil tiofanato al evaluar varias dosis (12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm), y transformar los datos de inhibición de crecimiento del micelio de *F. graminearum* en probits para obtener una regresión logarítmica. Como resultado se obtuvo que los aislamientos utilizados CE_{50} entre 12.1 y 64.03 ppm. Estos valores, no coinciden con lo obtenido en la presente investigación, ya que se requirió de menor concentración para inhibir el 50% del crecimiento de micelio (Figura 8) (1.97 ppm para el aislamiento F285 y 0.00016 ppm para los aislamientos F2, F239 y F297). Esto posiblemente se debe a que *F. oxysporum*, aislado de plantas de fresa y en las zonas donde se generó el estudio, no ha generado resistencia a esta molécula, como en otras partes del mundo o la respuesta al fungicida varía según la especie evaluada.

Pese a que se ha reportado la efectividad del ingrediente activo metil tiofanato en la reducción de la marchitez por *Fusarium*, causada por *F. oxysporum* f. sp. *niveum* en sandía (Everts et al., 2014), Petkar et al. (2017) demostraron que esta especie generó resistencia a la molécula, ya que se produjo una mutación en el gen de la β -tubulina, específicamente, al sustituir la fenilalanina por tirosina.

En el caso del porcentaje de germinación de conidios, al promediar cinco cepas de *F. oxysporum* Schldl. *sensu lato*, se obtuvo en la dosis mínima comercial un 78.52 % de germinación con iprodione, 0.75 % con pyraclostrobina + boscalid y 0 % con thiram, sin embargo, estos dos últimos no presentaron diferencias significativas entre ellos (Figura 10). El thiram es un fungicida utilizado a nivel mundial como tratamiento preventivo para

Fusarium en semillas (Nathawat & Kumari, 2022; Dukare & Paul, 2021; Jamil & Ashraf, 2020; Koch et al., 2020).

Este ingrediente activo, afecta el transporte entre membranas y enzimas deshidrogenasas involucradas en la respiración, por lo que están asociados a la inhibición de la germinación de esporas (Dias, 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios evalúa al thiram como PICM, tal es el caso de Tang et al. (2022), donde evaluaron la eficacia *in vitro* del thiram en concentraciones de 15, 30, 150, 300 y 500 ppm sobre *F. avenaceum*, los autores encontraron que se requieren de 136.49 ppm para inhibir el 50% del crecimiento del micelio del hongo. Este valor es superior al obtenido en el presente estudio, ya que la CE₅₀ para el aislamiento F285 fue de 8 ppm (Figura 13); sin embargo, en esta investigación se evaluó la germinación de conidios y no el crecimiento del micelio, por tanto, el resultado obtenido por Tang et al. (2022) no es comparable.

Existen fungicidas que cuentan con ambos modos de acción, es decir, inhiben el crecimiento del micelio y la germinación de conidios, ya que afectan los procesos de respiración y síntesis de proteínas estructurales (Baibakova et al., 2016; Tanaka & Izumitsu, 2010). Tal es el caso del ingrediente activo iprodione y la molécula compuesta por pyraclostrobina (inhibidor externo de quinona (Qols)) + boscalid (inhibidor del succinato deshidrogenasa (SDHIs)). En el caso de la iprodione, Shi et al. (2021) evaluaron la sensibilidad *in vitro* sobre el hongo *F. graminearum* en concentraciones de 0.2, 4, 8, 16, y 32 ppm, y se determinó que la CE₅₀ requerida es de 7.807± 0.507 ppm, muy superior a lo obtenido, en esta investigación se determinó una CE₅₀ de 0.00025 ppm (Figura 7).

En la presente investigación, el PICM de *Fusarium oxysporum* Schldl. *sensu lato* expuesto a de la pyraclostrobina + boscalid fue de 52 % en la dosis mínima comercial (Figura 3) mientras que el PGC fue de 0.75 % (Figura 10). Un estudio para evaluar la eficacia *in vitro*, realizado en Egipto, con el mismo producto comercial sobre *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium semitectum* y *Penicillium* spp. en concentraciones de 100, 200 y 400 ppm dió como resultado que en la dosis de 100 ppm se inhibe el 51 %

del crecimiento del micelio de *F. semitectum* (Youssef & Ruffo, 2020). En la presente investigación, se requirió de una concentración menor para inhibir el 50 % del crecimiento del micelio (CE₅₀ 0.186 ppm) (Figura 9).

En la Figura 11. B, se obtuvo que la pendiente va en dirección contraria, ya que la dosis más baja (x/100) tuvo menor germinación de conidios que las demás dosis. Esto pudo ocurrir por un error metodológico al no ajustar correctamente la concentración de conidios en la suspensión de esporas. El PGC se calcula a partir de un conteo, al evaluar solo 20 conidios por repetición, el número de observaciones se reduce y el porcentaje incrementa, es decir, en 100 conidios, cada conidio representa un 1 %, mientras que, en 20 conidios, cada conidio equivale a 5 %.

Existen estudios de eficacia donde se evaluaron los ingredientes activos pyraclostrobina y boscalid estudiados de manera individual. Al evaluar el boscalid en concentraciones 5, 50 y 500 ppm, se obtuvo una inhibición promedio del 7 % del crecimiento del micelio de *F. graminearum*, *F. proliferatum* y *F. verticillioides* en la dosis más alta, asimismo, la molécula inhibió el 100% de la germinación de conidios de las tres especies en la concentración más alta (Masiello et al., 2019). Esto coincide con lo observado en la Figura 12, donde cuatro de cinco aislamientos presentaron inhibición completa en la germinación de conidios. En otro estudio se determinó que, para la pyraclostrobina, la CE₅₀ fue de 0.017 a 0.26 ppm, mientras que para el boscalid la CE₅₀ fue de 127.59 y 192.43 ppm para inhibir el 50 % del crecimiento del micelio (Kang et al., 2022).

Los productos comerciales IPPON® 50 SC y BELLIS® 38 WG, utilizados en la presente investigación y con ingrediente activo iprodione y pyraclostrobina + boscalid respectivamente, no están registrados para el manejo de la marchitez por *Fusarium*. En Costa Rica para el cultivo de fresa, IPPON se registró para el control de *Alternaria* y *Botrytis*, mientras que BELLIS está registrado para control de *Botrytis* (SFE, 2021). Los resultados obtenidos en el presente estudio refuerzan lo anterior, ya que mostraron que estos fungicidas tienen baja eficacia para el control de *Fusarium oxysporum* en fresa.

Las variaciones en el PICM que pueden presentar *Fusarium* a nivel *in vitro* no solo dependen de la concentración del fungicida, sino también, del aislamiento y la especie evaluada (Masiello et al., 2019). Además, en ensayos de campo, la agresividad del aislamiento inoculado, la severidad de los síntomas y la eficacia del fungicida, pueden verse influenciados por las condiciones climáticas (Yerkovich et al., 2020). Las mutaciones, recombinaciones genéticas o la selección natural, también pueden contribuir en esta diferencia en la sensibilidad del patógeno (Sakr, 2018).

El aislamiento F285, presentó una menor sensibilidad a algunos de los fungicidas evaluados comparado a los otros cuatro aislamientos, es decir, para inhibir el crecimiento del micelio, este aislamiento requiere de una mayor concentración de ingrediente activo (Figuras 5.B, 8.B y 13.B). Amarasinghe et al. (2019) concluyen que si bien no encontraron diferencias en la severidad de daños causados por aislamientos de *F. graminearum* y *F. asiaticum*, la composición de los metabolitos secundarios de un aislamiento desempeña un papel clave en la determinación del nivel de sensibilidad de esa cepa ante una sustancia química. No obstante, 20 años atrás, un estudio realizado por Jardine & Leslie (1999) afirma que existen diferencias en la sensibilidad entre las especies *F. fujikuroi* (anteriormente *F. moniliforme*) y *F. thapsinum*, y entre aislamientos de la misma especie, al evaluar la patogenicidad de estas en dos líneas endogámicas de maíz cultivadas en condiciones de invernadero. Se desconoce la distribución del aislamiento F285 a nivel nacional o si está relacionado con la forma especial *fragariae* (*Fof*).

En la figura 9.C, se observa que con las dosis más bajas ($x/100$ y $x/50$) de pyraclostrobina + boscalid, el crecimiento del micelio del aislamiento F352 es mayor que en las dosis altas ($x/10$ y x). Esto coincide con la hormesis, un fenómeno toxicológico de respuesta a dosis, el cual genera estímulo a bajas concentraciones, mientras que conforme esta aumenta, se produce inhibición (Agathokleous et al., 2022). Una respuesta similar se observó al aplicar dosis de carbendazina en concentraciones de 10, 50 y 200 ppm a aislamientos de *B. cinerea* cultivados en medio PDA y se concluyó que la máxima

estimulación del crecimiento del micelio (9.5 %) ocurrió en la concentración de 50 ppm (Cong et al., 2018).

Hu et al. (2020) realizaron una investigación para probar el efecto hormético de boscalid (0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 y 0.2 ppm) sobre cuatros aislamientos cultivados en medio PDA de *Sclerotinia sclerotiorum*. En esta obtuvo que en las dosis de 0.0005, 0.001, 0.002 ppm existió entre 4.8 y 6.4 % de estimulación en el crecimiento del micelio, en comparación a las otras dosis. Otros estudios en *Sclerotinia* cultivada en medio PDA, demostraron que el 81 % de los aislamientos expuestos a metil tiofanato en 11 concentraciones, presentaron entre 2.8 y 19.7 % de estimulación en las dosis más bajas (Pradhan et al., 2018), mientras que al aplicar dimethachlone se produjo una estimulación entre 19.3 y 80.6 % (concentraciones de 10 y 50 ppm) y 9.3 y 11 % para el prochloraz (concentraciones de 0.0003 y 0.002 ppm) (Zhang et al 2019).

7. Conclusiones

Los cinco fungicidas evaluados provocaron inhibición del crecimiento del micelio de *F. oxysporum* Schltld. *sensu lato* en la dosis mínima comercial, sin embargo, el benomyl y el metil tiofanato presentaron mayor inhibición. En el caso del porcentaje de inhibición de la germinación de conidios, el thiram fue el fungicida más eficaz sobre *F. oxysporum* Schltld. *sensu lato*.

En esta investigación, se demuestra que los fungicidas iprodione y pyraclostrobina + boscalid presentan baja eficacia para el control de *F. oxysporum*.

Este trabajo evidenció la variabilidad de los aislamientos *F. oxysporum* utilizados al ser expuestos a diferentes fungicidas, estos pueden ser más o menos sensibles a cierto producto o dosis.

8. Recomendaciones

- Realizar las pruebas de eficacia de fungicidas con más dosis para ser más precisos en el cálculo de la CE₅₀.
- Llevar los resultados de los mejores fungicidas (benomyl, metil tiofanato y thiram) para el manejo de *F. oxysporum* Schltld. *sensu lato* a ensayos de campo.
- Identificar mediante marcadores moleculares específicos (Henry et al., 2017; Suga et al., 2013) si los aislamientos utilizados poseen relación con *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* (Fof).
- Determinar la sensibilidad a otros fungicidas al aislamiento F285.
- Evaluar más aislamientos *F. oxysporum* obtenidos de plantas de fresa con síntomas, ya que en la presente investigación solo fueron utilizados cinco aislamientos.

9. Financiamiento

Esta investigación contó con el apoyo de fondos facilitados por la Asociación de Profesionales en Enfermedades de las Plantas (APEP).

10. Referencias bibliográficas

- Agathokleous, E., Barceló, D., Rinklebe, J., Sonne, C., Calabrese, E.J., Koike, T. (2022). Hormesis induced by silver iodide, hydrocarbons, microplastics, pesticides, and pharmaceuticals: Implications for agroforestry ecosystems health. *Science of The Total Environment*, 820. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153116>
- Alaniz, S., Abad, P., García, J., & Armengol, J. (2011). Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum in vitro*, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 30, 489-494. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.12.020>
- Albuquerque, D., & Gusqui, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25 (2), 489-498. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209>
- Álvarez-Medina, A., Silva-Rojas, H., Leyva-Mir, S., Marbán-Mendoza, N., & Rebollar-Alviter, Á. 2017. Resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) to fungicides in Michoacán México. *Agrociencia*, 51 (7), 783-798.
- Amarasinghe, C., Sharanowski, B., & Fernando, W. G. D. (2019). Molecular phylogenetic relationships, trichothecene chemotype diversity and aggressiveness of strains in a global collection of *Fusarium graminearum* species. *Toxins*, 11 (5), 263. <https://doi.org/10.3390/toxins11050263>
- 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*, 50 (2), 172-178. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0029-x>

- Argomedo, A., Rodríguez, S., & Rodríguez, C. (2015). Efecto del fungicida metalaxyl sobre la germinación, crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* en condiciones de laboratorio. *Revista Científica Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo*, 3(2), 1-6.
- Ashwathi, S., Ushamalini, C., Parthasarathy, S., & Nakkeeran, S. (2017). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with Vascular Wilt of Coriander in India. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 6(5), 1055-1059.
- Ávalos, J., & Estrada, A. (2010). Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 930–938. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.001>
- Avitia, E., Pineda, J., Castillo, A. M., Trejo, L., Corona, T., & Cervantes, E. (2014). Extracción nutrimental en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (3), 519-524. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i3.955>
- Baibakova, E. V., Nefedjeva, E. E., Suska-Malawska, M., Wilk, M., Sevriukova, G. A., & Zheltobriukhov, V. F. (2016). Modern fungicides: mechanisms of action, fungal resistance and phytotoxic effects. *Annual Research & Review in Biology*, 32 (3), 1-16. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v32i330083>
- Baino, O., Salazar, S., Ramallo, A., & Kirschbaum, D. (2011). First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in northwestern Argentina. *Plant Disease*, 95 (11), 1477-1477. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0193>.
- Bashir, S., Mughal, M. N., Dar, S. A., Nissa, S., Hakeem, S., Wani, R. A., & Habib, M. (2017). *In vitro* efficacy of fungicides and bio-control agents against wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (11), 1392-1399. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611>
- Bennett, R. (2012). Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* chlamydospores under solarization temperatures. *Plant Disease*, 96 (10), 1564-1568. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0812-RE>
- Borrero, C., Bascón, J., Gallardo, M. Á., Orta, M. S., & Avilés, M. (2017). New foci of strawberry *Fusarium* wilt in Huelva (Spain) and susceptibility of the most commonly

- used cultivars. *Scientia Horticulturae*, 226, 85-90.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.034>
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?. Published by the Fungicide Resistance Action Committee 2007 FRAC Monograph 2nd edition. 60 p. ISBN 90-72398-07-6
- Butkutė, B., Mankevičienė, A., & Gaurilčikienė, I. (2008). A comparative study of strobilurin and triazole treatments in relation to the incidence of Fusarium head blight in winter wheat, grain quality and safety. *Cereal Research Communications*, 36 (6), 671– 676.
<https://doi.org/10.1556/CRC.36.2008.Suppl.B.58>
- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas, causas y efectos en cultivos extensivos. *Revista Agronomía y Ambiente*, 37 (1), 1-19.
- Castellanos, L., Lorenzo, M., Lina, B., Hernández, R., & Guillén, D. (2015). Efecto *in vitro* de plaguicidas comerciales sobre *Trichoderma harzianum* aislamiento A-34. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo*, 47 (2), 185-196.
- Cano, M. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7 (2), 263-276.
- Catalogue of life. (06 de mayo de 2021). *Annual Checklist*. Recuperado de <http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2019/browse/tree/id/22459404ea6b52d1dc110b70103d54a7>
- Cendoya, E., Nichea, M., Monge, M, Zchetti, V., Chiacchiera, S., & Ramirez, M. (2020). Effect of fungicides commonly used for Fusarium head blight management on growth production by *Fusarium proliferatum*. *Revista Argentina de Microbiología*.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.005>
- Centre for Agricultural Bioscience International (09 de mayo de 2021). *Distribution table of Fusarium oxysporum*. Recuperado de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24677#toDistributionMaps>
- Cerna, E., Alejandro, G., Ochoa, Y., Aguirre, L., Landeros, J., & Hernández, O. (2019). Evaluación *in vitro* de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos. *Scientia Fungorum*, 49, 1245-1251.
<https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1245>

- Chandler, C., Legard, D., Dunigan, D., Crocker, T., & Sims, C. (2000). 'Strawberry festival' strawberry. *HortiScience*, 35 (7), 1366–1367. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.7.1366>
- Chen, Y., Xu, Y., Zhou, T., Akkaya, M. S., Wang, L., Li, S., & Li, X. (2020). Biocontrol of Fusarium wilt disease in strawberries using bioorganic fertilizer fortified with *Bacillus licheniformis* X-1 and *Bacillus methylotrophicus* Z-1. *Biotech*, 10 (2), Article 80. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2060-6>.
- Chen, Z., Bertin, R. & Froidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.001>
- Cho, C., & Moon, B. (1985). Chemical control of Fusarium wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Korean Journal Plant Pathology*, 1 (11), 28-32. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1077A>.
- Cong, M., He, S., Ma, H., Li, G. & Zhu, F. (2018). Hormetic effects of carbendazim on the virulence of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 102 (5), 886-891. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1602-RE>
- Cruz, D., Leandro, L., & Munkvold, G. (2019). Effects of temperature and pH on *Fusarium oxysporum* and soybean seedling disease. *Plant Disease*, 103, 3234-3243. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1952-RE>.
- Cruz, D., Ellis, M., Munkvold, G., & Leandro, L. F. (2018). Isolate–cultivar interactions, *in vitro* growth, and fungicide sensitivity of *Fusarium oxysporum* isolates causing seedling disease on soybean. *Plant Disease*, 102 (10), 1928-1937. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0380-RE>.
- Dal Maso, E., Cocking, J., & Montecchio, L. (2014). Efficacy tests on commercial fungicides against ash dieback *in vitro* and by trunk injection. *Urban Forestry & Urban Greening*, 13(4), 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2014.07.005>
- de Lamo, F. J., & Takken, F. L. (2020). Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037>
- Dhingra, O., & Sinclair, J. (1985). *Basic plant pathology methods*. CRC Press Inc.

- Dias, M. C. (2012). Phytotoxicity: An overview of the physiological responses of plants exposed to fungicides. *Journal of Botany*, Article ID 135479, 4 pages. <https://doi.org/10.1155/2012/135479>
- Do, Y. J., Kim, D. H., Jo, M. S., Kang, D. G., Lee, S. W., Kim, J. W., & Hong, J. K. (2019). *In vitro* conidial germination and mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* coordinated by hydrogen peroxide and nitric oxide signalling. *The Korean Journal of Mycology*, 47 (3), 219-232. <https://doi.org/10.4489/KJM.20190026>
- Duan, Y., Yang, Y., Li, T., Zhao, D., Cao, J., Shi, Y., Wang, J., & Zhou, M. (2016). Development of a rapid and high-throughput molecular method for detecting the F200Y mutant genotype in benzimidazole-resistant isolates of *Fusarium asiaticum*. *Pest Management Science*, 72 (11), 2128–2135. <https://doi.org/10.1002/ps.4243>
- Dukare, A., & Paul, S. (2021). Biological control of *Fusarium* wilt and growth promotion in pigeon pea (*Cajanus cajan*) by antagonistic rhizobacteria, displaying multiple modes of pathogen inhibition. *Rhizosphere*, 17, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100278>
- Espinoza, D., Silva, H. V., Leyva, S. G., Marbán N., & Rebollar, Á. (2017). Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxystrobina. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (2), 186-203. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1612-4>
- Everts, K. L., Egel, D. S., Langston, D., & Zhou, X. G. (2014). Chemical management of *Fusarium* wilt of watermelon. *Crop Protection*, 66, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.09.003>
- Fang, X., Kuo, J., You, M., Finnegan, P., & Barbetti, M. (2012). Comparative root colonisation of strawberry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Plant Soil*, 358, 75–89. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1205-8>
- Fang, X., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., & Barbetti, M. (2011). Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 40, 109–119. <https://doi.org/10.1007/s13313-010-0019-5>

- Fisher, F. & Dewdney, M. (2013). Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) classification scheme of fungicides according to mode of action. University of Florida. Accesado el 20/06/2020. Disponible en <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PI/PI13100.pdf>
- Food and Agriculture Organization of United Nations (09 de mayo de 2021). FAOSTAT. Base de datos. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Fungicide Resistance Action Committee. (02 de febrero de 2021). FRAC Code List 2020: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action. Recuperado de https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-final.pdf?sfvrsn=8301499a_2
- García, C., González, C., Mora, L., Rodríguez, V., & Chaves, S. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 23 (1), 1-11. <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>
- Gaviria, V., Patiño, L., & Saldarriaga, A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp. en mora castilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 114 (1), 67-75. https://doi.org/10.21930/rcta.vol14_num1_art:344.
- Ghosal, D.; Tarafder, M. & Datta, B. (2020). *Fusarium oxysporum* isolates showed varied benzimidazole fungicides sensitivity under low temperature and heavy metal stress. *Rhizosphere*, 15, 100227. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100227>.
- Golzar, H., Phillips, D. & Mark, S. (2007). Occurrence of strawberry root and crown rot in Australia. *Australasian Plant Disease*, 2, 145-147. <https://doi.org/10.1071/DN07057>
- Gordon, T. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt syndrome. *Phytopathology*, 55, 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-fito-080615-095919>
- Gordon, T., Daugovish, O., Koike, S., Islas, C., Kirkpatrick, S., Yoshisato, J. & Shaw, D. (2016). Options for management of Fusarium wilt of strawberry in California. *International Journal of Fruit Science*, 16, 160–168. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1219294>
- Granados-Montero, M., Minter, D. W. & Castañeda-Ruiz, R. F. (2018). A checklist of asexual fungi from Costa Rica. *Mycotaxon*, 133 (2), 365–365. <https://doi.org/10.5248/133.365>

- Guillén, D., Cadenas, C. I., Alia, I., López, V., Andrade, M. & Juárez, P. (2017). Inhibición colonial *in vitro* de un aislado de *Colletotrichum acutatum* Simmonds a tratamientos con fungicidas. *Centro Agrícola*, 44 (4), 11-16. Versión impresa ISSN 2072-2001
- Gupta, P. 2018. Toxicity of Fungicides. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Third edition. 569–580 p. ISBN 9780123859273
- Hancock, J. F. (1999). *Strawberries. Crop Production Science in Horticulture*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 240 p. ISBN 9780851993393
- Heick, T. M., Justesen, A. F. & Jorgensen, L. N. (2017). Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicide in the Nordic-Baltic region. *European Journal Plant Pathology*, 149 (3), 669-682. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1216-7>
- Henry, P., Kirkpatrick, S., Islas, C., Pastrana, A., Yoshisato, J., Koike, S., Daugovish, O. & Gordon, T. (2017). The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, cause of Fusarium wilt of strawberry in California. *Plant Disease*, 101 (4), 550–556. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1058-RE>
- Hidalgo, J. (2019). Evaluación preliminar de la eficacia de tres fungicidas sobre *Fusarium oxysporum* Schltdl. asociado a plantas enfermas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Tesis para optar por el grado de profesional de Ingeniera Agrónoma. Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica. Sede Rodrigo Facio. 71 p.
- Hellin, P., King, R., Urban, M., Hammond-Kosack, K. & Legrève, A. (2018). The adaptation of *Fusarium culmorum* to DMI fungicides is mediated by major transcriptome modifications in response to azole fungicide, including the overexpression of a PDR transporter (*FcABC1*). *Frontiers in microbiology*, 9, 1385. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01385>
- Hobbelen, P., Paveley, N. & Bosch, F. (2014). The Emergence of Resistance to Fungicides. *PLoS ONE*, 9 (3), e 91910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091910>
- Hong, J. K., Yang, H. J., Jung, H., Yoon, D. J., Sang, M. K., & Jeun, Y. C. (2015). Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology journal*, 31 (3), 269-277. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0027>

- Hou, Y. P., Mao, X. W., Wang, J. X., Zhan, S. W. & Zhou, M. G. (2017). Sensitivity of *Fusarium asiaticum* to a novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicide pydiflumetofen. *Crop Protection*, 96, 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.011>
- Hu, S., Xu, Q., Zhang, Y., & Zhu, F. (2020). Stimulatory effects of boscalid on virulence of *Sclerotinia sclerotiorum* indicate hormesis may be masked by inhibitions. *Plant Disease*, 104 (9). <https://doi.org/10.1094/pdis-07-19-1421-re>
- Index Fungorum. (16 de mayo de 2021). Base de datos de especies de hongos. Recuperado de <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=218372>
- Instituto Tecnológico Superior de Coalcomán (ITSC). (06 de mayo de 2018). Manual de producción de fresa en Coalcomán, Michoacán. 53 p. Recuperado de <https://www.itscoalcoman.edu.mx/content/descargas/vinculacion/MANUAL%20PARA%20CULTIVO%20DE%20FRESA%20EN%20COALCOMAN.pdf>
- Jamil, A., & Ashraf, S. (2020). Utilization of chemical fungicides in managing the wilt disease of chickpea caused by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 876-898. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.180370>
- Jardine, D. J & Leslie, J. F. (1999). Aggressiveness to Mature Maize Plants of *Fusarium* Strains Differing in Ability to Produce Fumonisin. *The American Phytopathological Society*, 83 (7), 690 - 693. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.7.690p>
- Juber, K., Al-Juboory, H., & Al-Juboory, S. (2014). *Fusarium* wilt disease of strawberry caused by *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* in Iraq and its control. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 2 (4), 419-427. ISSN No. 2320 – 8694.
- Kang, J., Zhang, J., Liu, Y., Song, J., Ou, J., Tao, X., Zhou, M., Duan, Y. (2022). Mitochondrial dynamics caused by Qols and SDHIs fungicides depended on FgDnm1 in *Fusarium graminearum*. *Journal of Integrative Agriculture*. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2022.08.118>
- Kara, M., Oztas, E., Ramazanoğulları, R., Kouretas, D., Nepka, C., Tsatsakis, A. M. & Veskokis, A. (2020). Benomyl, a benzimidazole fungicide, induces oxidative stress

- and apoptosis in neural cells. *Toxicology Reports*, 7, 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.04.001>
- Karkee, A. & Mandal, D. L. (2020). Efficacy of fungicides against *Rhizoctonia solani* inciting rhizome rot diseases on large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 8 (1), 61-64. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v8i1.27240>
- Klix, M., Verreet, J. & Beyer, M. (2007). Comparison of the declining triazole sensitivity of *Gibberella zeae* and increased sensitivity achieved by advances in triazole fungicide development. *Crop Protection*, 26 (4), 683-690. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.006>
- Koch, E., Zink, P., Pfeiffer, T., von Galen, A., Linkies, A., Drechsel, J. & Birr, T. (2020). Artificial inoculation methods for testing microorganisms as control agents of seed- and soil-borne Fusarium-seedling blight of maize. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 883–893. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00350-w>
- Koike, S. & Gordon, T. (2015). Management of Fusarium wilt of strawberry. *Crop Protection*, 73, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.003>
- Koike, S., Gordon, R., Daugovish, O., Ajwa, H., Bolda, M. & Subbarao, K. (2012). Recent developments on strawberry plant collapse problems in California Caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. *International Journal of Fruit Science*, 13, 76–83. <https://doi.org/10.1080/15538362.2012.697000>
- Koike, S., Kirkpatrick, S. & Gordon, T. (2009). Fusarium wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*, 93 (10), 1077. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1077A>
- Köller, W., Avila-Adame, C., Olaya, G. & Zheng, D. (2002). Resistance to strobilurin fungicides. In *Agrochemical Resistance*; Clark et al., ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC. 215-229.
- Komura, R.; Kawakami, T.; Nakajima, K.; Suzuki, H. & Nakashima, C. (2018). Simultaneous detection of benzimidazole-resistant strains of Fusarium head blight using the loop-mediated isothermal amplification-fluorescent loop primer method. *Journal of General Plant Pathology*, 84 (4): 247–253. <https://doi.org/10.1007/s10327-018-0788-1>

- Kumari, M., Sharma, O. P., Sharma, K., Bagri, R. K. & Nathawat, B. (2020). Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* various systemic and non-systemic fungicides *in vitro*. *International Journal of Chemical Studies*, 8 (5), 2717-2720. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i5ak.10729>
- Kushwaha, N. & Kaushik, D. (2016). Recent advances and future prospects of phthalimide derivatives. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (03), 159-171. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60330>
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Iowa, United States of America: Blackwell Publishing Professional. 387 p. ISBN: 978-0-813-81919-8
- Liang, H., Li, J., Di, Y., Zhang, A. & Zhu, F. (2014). Logarithmic transformation is essential for statistical analysis of fungicide EC₅₀ values. *Journal of Phytopathology*, 163 (6), 456–464. <https://doi.org/10.1111/jph.12342>
- Lovato, A., Gutiérrez, S. & Carmona, M. A. (2017). Sensibilidad *in vitro* de *Trichoconiella padwickii* a diversos principios activos usados como fungicidas en el cultivo del arroz. *Revista Argentina de Microbiología*, 49 (1), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.002>
- Luo, W., Liu, L., Qi, G., Yang, F., Shi, X. & Zhao, X. (2019). Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in microcapsules for biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 85 (9), e03128-18. [https://doi.org/10.1128 / AEM.03128-18](https://doi.org/10.1128/AEM.03128-18)
- Ma, L., Geiser, D., Proctor, R., Rooney, A., O'Donwijn, K., Trait, F., Gardiner, D., Manners, J. & Kazan, K. 2013. *Fusarium* pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Maas, J. (2014). Strawberry diseases and pest- Progress and problems. *Acta Hortícola*, 1049, 133-142. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1049.11>
- Machado, F.; Santana, F.; Lau, D. & Del Ponte, E. 2017. Quantitative review of the effects of triazole and benzimidazole fungicides on *Fusarium* head blight and wheat yield in Brazil. *Plant Disease*, 101 (9), 1633–1641. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0340-RE>

- Magar, S., Patange, A. & Somwanshi, S. (2020). *In vitro* efficacy of fungicides, bioagents and silver nanoparticles against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Indian Phytopathology*, 73 (1), 65-69. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00182-1>.
- Malandrakis, A., Daskalaki, E., Skiada, V., Papadopoulou, K. & Kavroulakis, N. (2018). *Fusarium solani* endophyte vs fungicides: compatibility in a *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* – tomato pathosystem. *Fungal Biology*, 122, 1215-1221. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.10.003>
- Majchrowicz, I. & Poprawski, T. J. (1993). Effects *in vitro* of nine fungicides on growth of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 3 (3), 321-336. <https://doi.org/10.1080/09583159309355287>
- Maitlo, S. A., Syed, R. N., Rustamani, M. A., Khuhro, R. D. & Lodhi, A. M. (2014). Comparative efficacy of different fungicides against Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 46 (6), 2305-2312. ISSN 0556-3321
- Mamza, W., Zarafi, A. & Alabi, O. (2010). *In vitro* evaluation of six fungicides on radial mycelial growth and regrowth of *Fusarium pallidoroseum* isolated from castor (*Ricinus communis*) in Samaru, Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43 (2), 116-122. <https://doi.org/10.1080/03235400701806401>
- Marcellin, M. L., François, M. E., Valteri, V. A., Endali, E. M. J. & Begoude, B. A. D. (2018). *In vitro* study of the compatibility of six fungicides with two strains of *Trichoderma asperellum*, biocontrol agents used against cacao black pod disease in Cameroon. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 24 (4), 1834-1848. ISSN: 2028-9324
- Mariscal, L., Rivera, A., Dávalos, P. & Ávila, D. (2017). Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria×ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, 51, 673-681. Versión Online ISSN 2521-9766
- Martins, M., Pereira, P., Lima, N. & Cruz, J. 2013. Degradation of metalaxyl and folpet by filamentous fungi isolated from portuguese (Alentejo) vineyard soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65 (1), 67-77. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9877-5>

- Masiello, M., Somma, S., Ghionna, V., Logrieco, A. & 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), 11-29. <https://doi.org/doi:10.3390/toxins11010011>
- Matheron, M. & Porchas, M. (2010). Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for Fusarium wilt of lettuce. *Plant Disease*, 94 (11), 1323-1328. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-10-0296>
- Miller, M., Curry, K., Kreiser, B. & Smith, B. (2012). Visual and electronic evaluations of detached strawberry leaves inoculated with *Colletotrichum* species. *International Journal of Fruit Science*, 13, 114–125. <https://doi.org/10.1080/15538362.2012.697033>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio Fitosanitario del Estado e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2017). Manual de buenas prácticas agrícolas y de producción para el cultivo de la fresa. San José, Costa Rica: MAG-SFE. 72 p.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (06 de mayo de 2021) *Fragaria* spp. *Rosaceae*. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-0658fresa.pdf>
- Nathawat, B. D. S & Kumari, M. (2022). Management of wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* in chickpea. *Indian Journal. Plant Disease Research*, 37 (1), 35-39. <https://doi.org/10.5958/2249-8788.2022.00006.3>
- Nisa, T., Wani, A., Bhat, M., Pala, S. & Mir, R. (2011). *In vitro* inhibitory effect of fungicides and botanicals on mycelial growth and spore germination of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biopesticides*, 4 (1), 53-56. <https://doi.org/10.22192/ijarbs>
- Otiniano, A., Bello, S., Cruz, R., Borjas R. & Gamboa, R. (2015). Efecto de seis fungicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Mycena citricolor* (Berk & Curt). *Revista de la Facultad de Ingeniería de la USIL*, 2 (1), 9-16.
- Padvi, S. A., Hingole, D. G. & Khaire, P. B. (2018). *In vitro* efficacy of fungicides against *Fusarium solani* incited by dry root rot of sweet orange. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7 (4), 3270-3273. E-ISSN: 2278-4136

- Paredes, J. A., Cazon, L. I., Oddino, C., Monguillot, J. H., Rago, A. M. & Molina, J. E. (2021). Efficacy of fungicides against peanut smut in Argentina. *Crop Protection*, 140, Article 105403. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105403>
- Park, J. Y., Kim, S. H., Kim, N. H., Lee, S. W., Jeun, Y. C. & Hong, J. K. (2017). Differential inhibitory activities of four plant essential oils on in vitro growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* causing Fusarium wilt in strawberry plants. *The Plant Pathology Journal*, 33 (6), 582-589. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0133>
- Parker, J. E., Warrilow, A., Price, C., Mullins, J., Diane, E. & Kelly, D. (2014). Resistance to antifungals that target CYP51. *Chemical Biology*, 7 (4), 143-161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>
- Parra, E., Pérez, I., Alejo, J., Suárez, J. & Sánchez, E. R. (2011). Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. *Fitosanidad*, 15 (4), 231-236. ISSN: 1562-3009.
- Pasquali, M., Spanu, F., Scherm, B., Balmas, V., Hoffmann, L., Hammond, K., Beyer, M. & Migheli, Q. (2013). FcStuA from *Fusarium culmorum* controls wheat foot and root rot in a toxin dispensable manner. *PloS One*, 8 (2), e57429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057429>
- Pastrana, A., Watson, D. & Gordon, T. (2018). Transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* through stolons in strawberry plants. *Plant disease*, 103(6), 1249-1251. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1353-RE>
- Pastrana, A., Basallote, M. & Capote, N. (2017). Symptomless reservoirs of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and alternative hosts of *Fusarium solani* pathogenic to strawberry. *Journal of Plant Pathology*, 99 (1), 141-148. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i1.3786>
- Patón, L., Marrero, M. & Llamas, D. (2016). *In vitro* and field efficacy of three fungicides against *Fusarium* bulb rot of garlic. *European Journal of Plant Pathology*, 148 (2), 321–328. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1091-7>
- Paynter, M., Faveri, D. & Herrington, J. (2014). Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and predicted breeding values in strawberry. *Journal of the American*

Society for Horticultural Science, 139, 178–184.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.139.2.178>

- Pérez-Hernández, A., Rocha, L. O., Porcel-Rodríguez, E., Summerell, B. A., Liew, E. C., & Gómez-Vázquez, J. M. (2020). Pathogenic, morphological, and phylogenetic characterization of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* isolates from cucurbits in Almería Province, Spain. *Plant Disease*, 104 (5), 1465-1476. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1954-RE>
- Pérez-Hernández, A., Porcel-Rodríguez, E. & Gómez-Vázquez, J. (2017). Survival of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and fungicide application, soil solarization, and biosolarization for control of crown and foot rot of zucchini squash. *Plant Disease*, 101 (8), 1507-1514. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0883-RE>
- Petkar, A., Langston, D. B., Buck, J. W., Stevenson, K. L., & Ji, P. (2017). Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl. *Plant Disease*, 101 (2), 366–371. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-16-1236-re>
- Pincot, D., Poorten, T., Hardigan, M., Harshman, J., Acharya, C., Cole, G. & Knapp, S. (2018). Genome-wide association mapping uncovers Fw1, a dominant gene conferring resistance to Fusarium wilt in strawberry. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8 (5), 1817-1828. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200129>
- Pradhan, S., Miller, L., Marcillo, V., Koch, A. R., Graf Grachet, N., Molineros, J. E., Garzon, C. D. (2018). Hormetic effects of Thiophanate-Methyl in multiple isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. *Plant Disease*, 103 (1). <https://doi.org/10.1094/pdis-05-18-0872-re>
- Rafique, K., Rauf, C., Naz, F. & Shabbir, G. (2016). Management of vascular wilt of lentil through host plant resistance, biological control agents and chemicals. *Pakistan Journal of Botany*, 48 (5), 2085-2092. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.055>
- Rajput, A., Arain, M., Pathan, M., Jiskani, M. & Lodhi, A. (2006). Efficacy of different fungicides against *Fusarium* wilt of cotton caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Pakistan Journal of Botany*, 38 (3), 875-880. ISSN 0556-3321.

- Rekanović, E., Mihajlović, M. & Potočnik, I. (2010). *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl. *Pestici and I Fitomedicina*, 25 (4), 325-333. <https://doi.org/10.2298/PIF1004325R>
- Rentería, E., Guerra, M., Ochoa, A., Moreno, F., Meza, C. & Guzmán, M. (2019). Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37 (1), 16-34. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-1>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., & Gerhard, D. 2015. Dose-Response Analysis Using R. PLOS ONE, 10 (12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rodríguez, J. (2017). Elaboración de curvas de crecimiento y absorción de nutrimentos del cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Festival) en Fraijanes, Costa Rica. Tesis para optar por el grado de profesional de Ingeniero Agrónomo. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 126 p.
- Romero, S., Tiapal, B., Cadena, J., Nieto, D. & Arévalo, M.L. (2015). Hongos causantes de enfermedades postcosecha en chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y su control *in vitro*. *Agronomía Costarricense*, 39 (2), 19-32. <https://doi.org/10.15517/RAC.V39I2.21769>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Sakr, N. (2018). Aggressiveness of *Fusarium* head blight species towards two modern Syrian wheat cultivars in an *in vitro* petri-dish. *Cereal Research Communications*, 46 (3), 480–489. <https://doi.org/10.1556/0806.46.2018.031>
- Sahane, P. A., Chavan, R. A., Brahmkar, R. G., Kolhe, D. B. & Udar, V. B. (2021). *In vitro* efficacy of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10 (1), 978-984. E-ISSN: 2278-4136
- Sánchez, S., Henríquez, J., Urcolaa, L., Scott, A. & Gambardella, M. (2016). Susceptibility of strawberry cultivars to root and crown rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Berry Research*, 6, 345–354. <https://doi.org/10.3233/JBR-150114>

- Servicio Fitosanitario del Estado (SFE). (31 de enero de 2021). Consulta del registro de plaguicidas del cultivo de fresa. Recuperado de <http://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Insumos/ConsultaRegistroPlaguicida.aspx>
- Sevastos, A.; Labrou, N.; Flouri, F. & Malandrakis, A. 2017. Glutathione transferase-mediated benzimidazole-resistance in *Fusarium graminearum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 141, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.11.002>
- Shabani, F., Kumar, L. & Esmaeili, A. (2014). Future distributions of *Fusarium oxysporum* in european, middle eastern and north african agricultural regions under climate change. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 197, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.08.005>
- Sharma, R., Singh, B., Thakur, M. & Thapak, S. (2005). Effect of media, temperature, pH and light on the grow and sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (Bolley) Snyder and Hensan. *Annals of Plant Protection Science*, 13 (1), 172-174. P-ISSN: 0971-3573
- Shi, D., Ren, W., Wang, J., Zhang, J., Mbadianya, J. I., Mao, X. & Chen, C. (2021). The transcription factor FgNsf1 regulates fungal development, virulence and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Journal of Integrative Agriculture*, 20 (8), 2156–2169. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(20\)63339-1](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(20)63339-1)
- Siegel, M. R. (1971). Reactions of the fungicide folpet (N-(trichloromethylthio) phthalimide) with a thiol protein. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1 (2), 225-233. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(71\)90199-4](https://doi.org/10.1016/0048-3575(71)90199-4)
- Sistema Nacional de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (25 de marzo de 2020). Plan estratégico PITTA 2017 (Programa de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria) Fresa. Página web. Recuperado de http://www.snitta.org/web/pittas.php?p=32&s=PLAN_ESTRATEGICO
- Suga, H., Hirayama, Y., Morishima, M., Suzuki, T., Kageyama, K. & Hyakumachi, M. (2013). Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Plant Diseases*, 97, 619-625. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0663-RE>

- Tanaka, C., & Izumitsu, K. (2010). Two-component signaling system in filamentous fungi and the mode of action of dicarboximide and phenylpyrrole fungicides. *Fungicides*, 1, 523-538. <https://doi.org/10.5772/13774>
- Tang, X., Yangjing, G., Zhuoma, G., Guo, X., Cao, P., Yi, B., Wang, W., Ji, D., Pasquali, M., Baccelli, I., Migheli, Q., Chen, X. & Cernava, T. (2022). Biological characterization and in vitro fungicide screenings of a new causal agent of wheat Fusarium head blight in Tibet, China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 941734. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.941734>
- Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Valè, G., Tacconi, G. & Malnati, M. (2007). In vitro antifungal activity of the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (6), 613–618. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02128.x>
- Torres, G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17 (1-3), 11-16. E-ISSN: 2357-3732
- Vásquez, 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.) Merr.”. Tesis para optar por el grado de profesional de Ingeniero Agrónomo. Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Sede Regional San Carlos. 1-87.
- Wachowska, U., Irzykowski, W. & Jędryczka, M. (2018). Agrochemicals: effect on genetic resistance in yeasts colonizing winter wheat kernels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.042>
- Weber, R. & Hahn, M. (2019). Grey mould disease of strawberry in northern Germany: causal agents, fungicide resistance and management strategies. *Applied Microbiological Biotechnology*, 103, 1589–1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09590-1>
- Willyerd, K., Li, C., Madden, L., Bradley, C., Bergstrom, G., Sweets, L., McMullen, M., Ransom, J., Osborn, L. & Paul, P. (2012). Efficacy and stability of integrating fungicide

- and cultivar resistance to manage Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat. *Plant Disease*, 96(7), 957–967. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0763>
- Winks, B. & Williams, Y. (1965). A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Science*, 22, 475-479.
- Xia, K., Shena, S., Gao, Q., Shang, W. & Pana, Y. (2017). Identification of a novel low-level impurity in fungicide pyraclostrobin by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138, 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.027>
- Yadav, S. & Ansari, M. (2017). Isolation, identification and in vitro evaluation of fungicides against Fusarium leaf blight of soybean caused by *F. oxysporum*. *Soybean Research*, 15 (1), 46-55.
- Yan, W., Wang, X., Li, K., Li, T. X., Wang, J. J., Yao, K. C. & Ye, Y. H. (2019). Design, synthesis, and antifungal activity of carboxamide derivatives possessing 1, 2, 3-triazole as potential succinate dehydrogenase inhibitors. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 156, 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.017>
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V. & Gan, Y. (2011). Fungicide modes of action and possible impact on non-target microorganisms. *International Scholarly Research Network*, Article ID 130289. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>
- Yerkovich, N., Cantoro, R., Palazzini, J., Torres, A., & Chulze, S. N. (2020). Fusarium head blight in Argentina: Pathogen aggressiveness, triazole tolerance and biocontrol-cultivar combined strategy to reduce disease and deoxynivalenol in wheat. *Crop Protection*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105300>
- Yossen, V. & Conles, M. (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. E-ISSN: 1851-3018
- Youssef, K. & Ruffo, S. (2020). Premature Apple Fruit Drop: Associated Fungal Species and Attempted Management Solutions. *Horticulturae*, 6 (2), 31. <https://doi.org/10.3390/horticulturae6020031>

Zhang, R., Zhang, Y., Xu, Q., Li, J., & Zhu, F. (2019). Hormetic effects of mixtures of dimethachlone and prochloraz on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 103 (3). <https://doi.org/10.1094/pdis-06-18-1071-re>

Zúñiga, M. (2020). Identificación y patogenicidad de hongos posibles causantes de muerte de plantas en el cultivo de fresa en la zona de Llano Grande, Cartago, Costa Rica. Tesis para optar por el grado de profesional de Ingeniera Agrónoma. Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica. Sede Guanacaste. 1-47.

Anexo I. Descripción de los fungicidas a utilizar (modo y sitio de acción, grupo químico, ingrediente activo, producto comercial, dosis en fresa y efecto sobre el hongo) en pruebas de eficacia de fungicidas que inhiben el crecimiento del micelio (CM) y la germinación de conidios (GC).

Modo de acción	Sitio de acción	Grupo químico	Ingrediente activo	Nombre del producto comercial	Dosis mínima en fresa	Efecto en el hongo
B: Citoesqueleto y motor de proteínas	B1: Ensamblaje de la β -tubulina en la mitosis	Benzimidazol	benomyl	AFUNGIL® 50 WP	400 g/ 200 L agua	CM
		Tiofanato	metil tiofanato	TIOFANIL® 50 SC	0,7 L/ 400 L agua	CM
E: Transducción de señales	E3: transducción de MAP / Histidina-quinasa en señales osmóticas	Dicarboximida	iprodiona	IPPON ® 50 SC	1,5 L/ 400 L agua	CM y GC
C: Respiración	C3: Inhibidor externo de quinona (Qo-I) / C2: Inhibidor de succinato deshidrogenasa	Estrobirulina/ Carboxamida	pyraclostrobina + boscalid	BELLIS ® 38 WG	1g/ L agua	CM y GC
M: Actividad multisitio de contacto	-	Ftalamida	folpet	FOLPAN® 80 WG	125 g/ 200 L agua	CM
		Ditiocarbamato	thiram	THIRAM Granulfo ® 80 WG	2 kg/ 400 L agua	GC