



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA DE AGRONOMÍA

**“EVALUACION DE LA PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD DE
AISLADOS DE *Neopetalotiopsis* sp. Y *Fusarium* sp. ASOCIADOS A
LA PUDRICIÓN DE CORONA DE FRUTILLA (*Fragaria ananassa*
DUCH.), EN INVERNADERO”**

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA: ANGHELA VANESSA VALLEJO GARCES

DIRECTOR: Ing. FERNANDO RIVAS FIGUEROA PhD.

RIOBAMBA – ECUADOR

2021

© 2021, Anghela Vanessa Vallejo Garcés

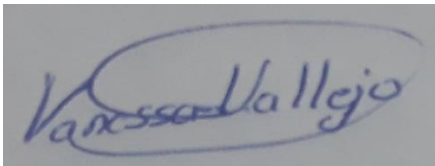
Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Anghela Vanessa Vallejo Garcés declaro que el presente trabajo de integración curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos.

Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de Integración curricular. El patrimonio intelectual pertenece a las Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 11 de julio de 2021

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature reads "Vanessa Vallejo" in a cursive script.

Anghela Vanessa Vallejo Garcés

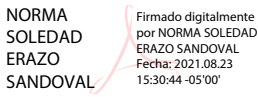
0604132043

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

CARRERA DE AGRONOMÍA


El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; Tipo: Proyecto de investigación, **“EVALUACION DE LA PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD DE AISLADOS DE *Neopestalotiopsis* sp. Y *Fusarium* sp. ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DE CORONA DE FRUTILLA (*Fragaria ananassa* DUCH.), EN INVERNADERO”** realizado por la señorita: **ANGHELA VANESSA VALLEJO GARCES**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Norma Erazo Sandoval PhD.	 NORMA SOLEDAZ ERAZO SANDOVAL	2021-07-16
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		

Ing. Fernando José Rivas Figueroa PhD.	 Firmado electrónicamente por: FERNANDO JOSE RIVAS FIGUEROA	2021-07-16
--	--	------------

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero. PhD.	 PABLO ISRAEL ALVAREZ ROMERO	2021-07-16
--	---	------------

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURA	x
INDICE DE GRÁFICOS.....	xi
INDICE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
IMPORTANCIA	1
PROBLEMA.....	2
CAPÍTULO I.....	3
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	3
1.1 Cultivo de frutilla.	3
<i>1.1.1 Generalidades</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2 Requerimientos edafoclimáticos</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 Morfología de la planta.....</i>	<i>4</i>
1.2 Principales enfermedades reportadas a nivel mundial.	5
1.3 Pudrición de la corona.....	7
<i>1.3.1 Síntomas asociados a la pudrición de corona</i>	<i>7</i>
<i>1.3.2. Organismos fungosos asociados a la pudrición de corona.....</i>	<i>7</i>
<i>1.4.1 Neopestaloptiosis sp.....</i>	<i>10</i>
<i>1.4.2 Fusarium sp.....</i>	<i>11</i>
1.4 Patogenicidad.....	13
1.5 Agresividad	13
1.7 Postulados de Koch	13
2.1 Características del lugar	15
<i>2.1.1 Localización.....</i>	<i>15</i>
<i>2.1.2 Ubicación geográfica</i>	<i>15</i>
2.2 Materiales y equipo	15

2.2.1	<i>Material biológico</i>	15
2.2.2	<i>Medios de cultivo</i>	16
2.2.3	<i>Reactivos</i>	16
2.2.4	<i>Materiales del laboratorio</i>	16
2.2.5	<i>Equipos del laboratorio</i>	17
2.2.6	<i>Material de campo</i>	17
2.2.7	<i>Materiales de oficina</i>	17
2.3.	Métodos	18
2.3.1	<i>Reactivación de los aislados de Fusarium sp. y Neopestaloptiosis sp.</i>	18
2.3.2	<i>Preparación de suspensiones conidiales de Fusarium sp., y Neopestalotipsis sp., para la inoculación de plantas de frutilla</i>	18
2.3.3	<i>Preparación de las plantas de frutilla</i>	18
2.3.4	<i>Inoculación</i>	19
2.3.4	<i>Determinación de parámetros asociados con agresividad: Índice de infección, área bajo la curva del progreso de la enfermedad y la severidad de pudrición para las plantas inoculadas con los hongos de Neopestalotiopsis sp y de Fusarium sp.</i>	19
2.3.5	<i>Germinación, esporulación y tasa de crecimiento micelial</i>	20
2.3.6	<i>Re-aislamiento de agentes fúngicos</i>	21
2.3.7	<i>Diseño experimental</i>	21
CAPITULO III		25
3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS	25
3.1	Resultado y discusión	25
3.1.1	<i>Evaluación cualitativa de los síntomas causados por Neopestalotiopsis sp., y Fusariumsp</i>	25
3.1.2	<i>Índice de infección</i>	29
3.1.3	<i>Curva de progreso de la enfermedad</i>	29
3.1.4	<i>Evaluación de la severidad de la pudrición de la corona en plantas de Frutilla</i>	31
1.1.1	<i>Crecimiento micelial de los aislados fúngicos de Neopestalotiopsis sp. y Fusarium sp</i>	34

<i>1.1.2 Germinación y esporulación de los aislados fúngicos</i>	40
<i>1.1.3 Re-aislamiento</i>	42
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
GLOSARIO	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía de la planta de frutilla.....	3
Tabla 2-1:	Enfermedades causadas por nemátodos en plantas de frutilla.....	6
Tabla 3-1:	Enfermedades causadas por bacterias en plantas de frutilla.....	6
Tabla 4-1:	Enfermedades causadas por virus en plantas de frutilla.....	6
Tabla 5-1:	Principales organismos fungosos, síntomas asociados a la pudrición de corona de las plantas de frutilla y países donde fueron reportados.....	8
Tabla 6-1:	Taxonomía de <i>Neopestalotiopsis</i> sp.....	10
Tabla 7-1:	Taxonomía de <i>Fusarium</i> sp.....	12
Tabla 8-2:	Tratamientos establecidos para experimento <i>in vivo</i> (invernadero).....	22
Tabla 9-2:	Tratamientos establecidos para la evaluación de la tasa de crecimiento micelial.....	22
Tabla 10-2:	Tratamientos establecidos para la evaluación de la esporulación de los aislados fúngicos.....	23
Tabla 11-2:	Tratamientos establecidos para la evaluación de la germinación de los aislados fúngicos.....	24
Tabla 12-3:	Análisis de varianza para el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.....	30
Tabla 13-3:	Test de Tukey para el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad para plantas inoculadas por el método de punción.....	30
Tabla 14-3:	Test de Tukey para el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad para plantas inoculadas por el método de suspensión.....	30
Tabla 15-3:	Análisis de varianza de la severidad de la pudrición de la corona de plantas de frutilla.....	32
Tabla 16-3:	Test de Tukey dentro del nivel método de punción de la severidad de la pudrición de corona de plantas de frutilla.....	32
Tabla 17-3:	Test de Tukey dentro del nivel método de suspensión de la severidad de la pudrición de corona de plantas de frutilla.....	32

Tabla 18-3:	Análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial.....	38
Tabla 19-3:	Test de Tukey para la tasa de crecimiento micelial en medio PDA	39
Tabla 20-3:	Test de Tukey para la tasa de crecimiento micelial en medio SNA	39
Tabla 21-3:	Análisis de varianza para la germinación de esporas.	40
Tabla 22-3:	Test de Tukey para la germinación de esporas.	41
Tabla 23-3:	Análisis de varianza de la variable esporulación.....	42
Tabla 24-3:	Test de Tukey para la variable esporulación.	42

INDICE DE FIGURA

Figura 1-3:	Síntomas causados por <i>Neopestalotiopsis</i> sp. (a) manchas necróticas, (b–c) hojas secas y enrolladas, (d) ennegrecimiento del peciolo, (e-f) marchitamiento foliar de la planta.	26
Figura 2-3:	Sintomatología externa de las plantas inoculadas con <i>Neopestalotiopsis</i> sp., mediante el método de suspensión.	26
Figura 3-3:	Síntomas internos inoculadas con <i>Neopestalotiopsis</i> sp. (a) necrosamiento de la corona por el método de puncion, (b) necrosamiento de la corona por en el método de suspensión.	27
Figura 4-3:	Plantas de frutilla inoculadas con diferentes especies de <i>Fusarium</i> sp. (a-b) Plantas inoculadas con <i>F. oxyporum</i> , (c-d) Plantas inoculadas con <i>F. tricinctum</i>	28
Figura 5-3:	Caracteres culturales y morfológicos de <i>Neopestalotiopsis</i> sp., (a) colonia de <i>Neopestalotiopsis</i> sp, en medio PDA, (b) conidios pigmentados con 3 células y 3 apéndices.	43

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Curva del progreso de enfermedad de los aislados fúngicos <i>Neopestalotipsis</i> sp., y <i>Fusarium</i> sp.	29
Gráfico 2-3:	Evaluación de la severidad de la pudrición de plantas de frutilla inoculadas con <i>Neopestalotipsis</i> sp., y <i>Fusarium</i> sp.	31
Gráfico 3-3:	Crecimiento micelial en medio PDA y SNA de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Neopestalotipsis</i> sp., a una temperatura de 25°C.	34
Gráfico 4-3:	Crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Neopestalotipsis</i> sp., a una temperatura de 30°C.	36
Gráfico 5-3:	Tasa de crecimiento micelial en medio PDA y SNA a una temperatura de 25°C y 30°C de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Neopestalotipsis</i> sp.	38
Gráfico 6-3:	Germinación de las esporas <i>Neopestalotipsis</i> sp., y <i>Fusarium</i> sp.	40
Gráfico 7-3:	Esporulación de <i>Neopestalotipsis</i> sp., y <i>Fusarium</i> sp., sembradas en medio SNA, evaluadas a los 8 días.	41

INDICE ANEXOS

- ANEXO A:** MANEJO CULTURAL DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA EN INVERNADERO.
- ANEXO B:** INOCULACIÓN DE *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp. POR EL MÉTODO DE SUSPENSIÓN Y PUNCIÓN
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE INOCULO DE *Neopestalotiopsis* sp., Y *Fusarium* sp.
- ANEXO D:** EXPERIMENTO DE LA GERMINACIÓN DE *Neopestalotiopsis* sp.
- ANEXO E:** EXPERIMENTO DE LA ESPORULACIÓN Y GERMINACIÓN DE *Fusarium* sp
- ANEXO F:** EVALUACIÓN DE NIVEL DE NECROSIS DE LA CORONA USANDO MEDIANTE EL USO DEL PROGRAMA SOFTWARE ASSESS 2.0.
- ANEXO G:** INFORMACION DE LOS AISLADOS FÚNGICOS
- ANEXO H:** EVALUACIÓN DEL INDICE DE INFECCIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS
- ANEXO I:** EVALUACIÓN DEL ÁREA BAJO LA CURVA
- ANEXO J:** EVALUACIÓN PROMEDIO DE LA SEVERIDAD DE PUDRICIÓN DE CORONA.
- ANEXO K:** EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE LOS AISLADOS FÚNGICOS EN MEDIO SNA Y PDA A UNA TEMPERATURA DE 25°C.
- ANEXO L:** EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE LOS AISLADOS FÚNGICOS EN MEDIO SNA Y PDA A UNA TEMPERATURA DE 30°C.
- ANEXO M:** EVALUACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE LOS AISLADOS FÚNGICOS EN MEDIO SNA Y PDA A UNA TEMPERATURA DE 25°C Y 30°C.
- ANEXO N:** EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS ESPORAS DE LOS AISLADOS FÚNGICOS.

- ANEXO O:** EVALUACIÓN DE LA ESPORULACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS.
- ANEXO P:** CORTE LONGITUDINAL DE LA CORONA DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA INOCULADAS CON *Neopestalotiopsis* sp. CEPA 1 (MÉTODO DE INOCULACION PORSUSPENSIÓN)
- ANEXO Q:** CORTE LONGITUDINAL DE LA CORONA DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA INOCULADAS CON *Neopestalotiopsis* sp. cepa 1 (MÉTODO DE INOCULACION POR PUNCIÓN)
- ANEXO R:** CORTE LONGITUDINAL DE LA CORONA DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA INOCULADAS CON *Fusarium oxysporum* (MÉTODO DE INOCULACIÓN POR PUNCIÓN Y SUSPENSIÓN)

RESUMEN

Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar el nivel de patogenicidad y agresividad de los hongos *Fusarium* sp. y *Neopestalotiopsis* sp., asociados a la pudrición de corona en plantas sanas de frutilla en invernadero. El proceso se inició con la reactivación de los dos aislados fúngicos cultivados en medio PDA durante 7 días, luego transcurrido este tiempo, para la preparación del inóculo (suspensiones conidiales) las cepas de *Fusarium* sp. y *Neopestalotiopsis* sp., fueron cultivadas en medio SNA durante 15 días. Posterior al micelio cultivado en medio SNA, se procedió a añadir 10 mL de agua destilada e inmediatamente se raspo suavemente la superficie del micelio hasta obtener una suspensión de esporas. Finalmente se procedió a realizar el conteo de los aislados fúngicos, permitiendo de esta manera realizar el ajuste en su concentración de 1×10^5 . La inoculación de las plantas se realizó mediante dos métodos: el método de punción el cual consistió en inyectar 5mL de inóculo en la parte superior de la corona directamente a la zona meristemática mediante el uso de jeringuillas estériles, el método de suspensión consistió en colocar 50 mL de inóculo en el sustrato alrededor de la corona de la planta de frutilla. Las plantas inoculadas por el método de punción por el hongo *Neopestalotiopsis* sp., presentaron una sintomatología externa (manchas necróticas, ennegrecimiento del peciolo, marchitamiento de la planta) y sintomatología interna (pudrición y necrosamiento de los tejidos de la corona) demostrando ser patogénicas. Las plantas inoculadas por las especies de *Fusarium* sp., no fueron patogénicas esto se comprobó al no existir síntomas a nivel del filo plano por los dos métodos de inoculación. Se recomienda realizar estudios para la evaluación de antagonistas para el control biológico y químico.

Palabras clave: <PATOGENICIDAD> <AGRESIVIDAD> <HONGO (*Fusarium* sp.)> <HONGO (*Neopestalotiopsis* sp.)> <INOCULACIÓN> <PUNCIÓN> <SUSPENSIONES CONIDIALES>

Firmado digitalmente por LUIS ALBERTO CAMINOS VARGAS
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, o=UNIVERSIDAD DEL SAZUZA, ou=UNIVERSIDAD DEL SAZUZA, cn=LUIS ALBERTO CAMINOS VARGAS
Fecha: 2021.08.04 15:49:33 -05'00'



1500-DBRA-UTP-
2021

ABSTRACT

This investigation aims to evaluate the level of pathogenicity and aggressiveness of the fungi *Fusarium sp.* and *Neopestalotiopsis sp.* causing crown rot in healthy strawberry plants in greenhouses. The process was carried out by the reactivation of the two fungal isolates cultivated on PDA medium for 7 days. After this time, the strains of *Fusarium sp.* and *Neopestalotiopsis sp.* were cultivated on SNA medium for 15 days for the preparation of the inoculum (conidial suspensions). After the mycelium was cultivated in SNA medium, 10 mL of distilled water was added and immediately the mycelium surface was gently scraped until a spore suspension was obtained. Finally, it is proceeded to count the fungal isolates to adjust their concentration to 1×10^5 . The inoculation of the plants was carried out by the puncture method consisting of injecting 5 mL of inoculum in the upper part of the crown directly into the meristematic zone using sterile syringes, and the suspension method consisting of placing 50 mL of inoculum in the substrate around the crown of the strawberry plant. Plants inoculated by the puncture method by the fungus *Neopestalotiopsis sp.* showed external symptoms (necrotic spots, blackening of the petiole, wilting of the plant) and internal symptoms (rotting and necrosis of the crown tissues), proving to be pathogenic. Plants inoculated by *Fusarium sp.* species were not pathogenic, and it was tested by the absence of symptoms at the level of the flat phylum by the two inoculation methods. It is recommended to carry out studies for the evaluation of antagonists for biological and chemical control.

Key words: <PATHOGENICITY> <AGGRESSIVITY> <FUNGI (*Fusarium sp.*)> <FUNGI (*Neopestalotiopsis sp.*)><INOCULATION> <PUNCTURE> <CONIDIAL SUSPENSIONS>.

INTRODUCCIÓN

La frutilla es un cultivo de gran importancia a nivel mundial, el continente Asiático es considerado líder en su producción, representando un 46% del porcentaje promedio global en el período 2004 al 2014; uno de los países asiáticos líderes en este cultivo es China, siendo el líder absoluto con una producción global de 2'273.233,9 t de frutilla; mientras, que el continente americano ocupa el segundo lugar con un porcentaje del 25,3%, Estados Unidos como su principal representante tiene una producción global de 1'233.375,4 t y Europa en tercer lugar con 22,7%; específicamente España con 294.240,5 t. Sin embargo, el único país latinoamericano que se encuentra dentro de los diez países principales productores de frutilla es México encontrándose en quinto lugar con una producción de 254.821,9 t de frutillas (FAOSTAT, 2017).

Otuna (2012,p.6-7) menciona a Ecuador como un país con la capacidad de producir 30.000 t mensuales de fruta, no obstante, en el año 2014 su producción disminuyó a 1.620 t de fruto en un área de 105 ha, de las cuales el 60 % es destinado para consumo nacional, siendo su uso principalmente para consumo fresco o procesado (helados, yogur, mermeladas) y el restante se exportó a Estados Unidos y España. Actualmente existe una tendencia en el crecimiento de la superficie del cultivo debido a su alta tasa de rentabilidad siendo la principal provincia productora Pichincha con aproximadamente el 50% del área producida en Ecuador. Debido a esta rentabilidad los agricultores de Pichincha, parte de Azuay e Imbabura entre otras localidades se han permitido tener superficies pequeñas del cultivo de frutilla (Otuna, 2012,p. 6-7).

IMPORTANCIA

El cultivo de frutilla ha mostrado una gran demanda a nivel nacional e internacional, debido que su fruto posee beneficios saludables, siendo su destino para los mercados en fresco y productos industriales de conservas, congelados, jugos, pulpa, fruto deshidratado; el cultivo de frutilla ha beneficiado a los productores principalmente por el número de empleos que genera y a la participación de la familia y comunidad. Sin embargo, a pesar de ser la zona interandina un lugar con las condiciones favorables para la producción del cultivo de frutilla, el agricultor no ha garantizado buenos rendimientos económicos debido a los precios de los productos en fresco, por esta razón le han dado un valor agregado por medio de la industrialización del fruto (Palchisaca,2018, p. 1-3).

PROBLEMA

La producción de frutilla en los últimos años ha presentado un descenso en el rendimiento del cultivo debido a la presencia de problemas fitosanitarios como enfermedades de la corona y raíz, Zazzetta, et al., (2018,p.17-23) menciona que las enfermedades de la corona y raíz son difíciles de controlar debido que los patógenos: *Fusarium* sp., y *Neopestalotiopsis* sp., que las causan, en general, forman estructuras de resistencia que permanecen en el suelo durante mucho tiempo, y se multiplican a través de los años, teniendo en cuenta la importancia de las enfermedades de la corona y raíz, la ausencia de estudios para evaluar la patogenicidad y agresividad de aislados fúngicos asociados a esta enfermedad en este cultivo de trascendental importancia, este trabajo propuso la evaluación de patogenicidad y agresividad de los aislados de *Fusarium* sp., y *Neopestalotiopsis* sp., asociados a la pudrición de corona de frutilla (*Fragaria ananasa* Duch) en invernadero.

OBJETIVOS

General

Evaluar la patogenicidad y agresividad de aislados de *Neopestalotiopsis* sp., y *Fusarium* sp., asociados a la pudrición de la corona en plantas sanas de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.), en invernadero.

Específico

- Caracterizar los síntomas cualitativamente de las plantas inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp.
- Determinar la severidad mediante el índice de infección y la severidad de pudrición de las plantas enfermas inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp., basados en cuantificación mediante escala de notas descriptiva, y la utilización del Software Assess 2.0.
- Evaluar la agresividad de diferentes aislados de *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp. asociados a la pudrición de corona de frutilla (*Fragaria ananassa* Duch.).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Cultivo de frutilla.

1.1.1 Generalidades

La frutilla es conocida también como: Fresa en español, Fragola en latín, Morango en portugués, Fraise en francés y como Strawberry en inglés (LLumiquinga, 2017, p.3).

La frutilla apareció como consecuencia de cruzamientos producidos en Europa entre *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana*, designados por Duchesne con el nombre científico *Fragaria x ananassa* Duch, llegando a constituir la especie botánica básica de todas las variedades de frutilla para su comercialización (Folquer, 1986; citados en Barreiro, 2017, p. 2).

La frutilla es una planta perenne, de una altura pequeña, sus raíces llegan a una profundidad de 30 cm, con hojas trifoliadas de forma oval; su vida es corta que puede durar dos años en producción económica, dependiendo de las condiciones climáticas y ambientales de la zona, cultivada para la producción y comercialización de sus frutos en el mercado a nivel nacional e internacional, siendo de esta manera para su consumo en fresco, deshidratado, pulpa y jugo, debido a que es muy apetecido por los consumidores por su delicado sabor, agradable aroma y color rojo intenso (El Efecto Rayleigh, 2013; citados en Badenier, 2015, p. 18).

Tabla 1-1: Taxonomía de la planta
de frutilla.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia	Rosoideae
Tribu:	Potentilleae

Subtribu:	Fragariinae
Género	<i>Fragaria</i>
Especie	<i>ananassa</i>

Fuente: (Bonet, 2010, p.3)

1.1.2 *Requerimientos edafoclimáticos*

Temperatura: La frutilla es una planta que puede adaptarse a varios climas, siendo la temperatura adecuada entre los valores de 15 a 20 °C como media anual. Las temperaturas inferiores a 12°C producen frutos con deformaciones; mientras que temperaturas altas puede originar una acelerada maduración y coloración del fruto, provocando que la frutilla no alcance un adecuado tamaño para su comercialización (Lozada, 2017; citados en Castro, 2018,p. 10).

Suelo: El cultivo de frutilla se desarrolla adecuadamente en suelos, sueltos, aireados, bien drenados y en suelos moderadamente ácidos con valores entre 5,7-6.5, el tipo de suelo para el mejor desarrollo del cultivo debe ser arenoso o franco arenoso (Cámara de comercio de Bogotá,2015,p.11-12).

Agua: Para un buen desarrollo de la frutilla es importante la calidad del agua debido que la planta de frutilla es muy sensible a elementos químicos. El agua no debe tener una conductividad eléctrica mayor a 0,8 dS/m, para permitir una alta producción y evitar problemas por presencia de sodio, calcio, boro o cloruros que afectan el desarrollo de la planta, la firmeza y tamaño del fruto (Morales et al., 2017,p. 19-23).

1.1.3 *Morfología de la planta*

Cuevas-Álvarez et al.(2018,p.2-4) menciona que la morfología de la planta de frutilla es la siguiente:

Es una planta de tipo herbáceo y perenne, con estolones que enraízan en el ápice y hojas compuestas trifoliadas completamente. En general este cultivo tiene un tiempo de producción, comercialmente viable, de dos años.

Sistema radicular: es fasciculado, se compone de raíces y raicillas estas sufren un proceso de renovación fisiológico, teniendo una profundidad aproximada de 40 cm.

Tallo: constituido por un eje corto de forma cónica llamado corona, en el que se observan numerosas escamas foliares.

Estolones: conocidos como un brote delgado, largo, rastrero, que se forma a partir de las yemas axilares de las hojas situadas en la corona siendo un método de propagación.

Hojas: son largamente pecioladas y provistas de dos estipulas rojizas, su limbo está dividido en tres foliolos pediculados de bordes aserrados.

Inflorescencias: se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona, o de yemas axilares de las hojas.

Flor: tiene de 5-6 pétalos, de 20 a 35 estambres y muchos pistilos sobre un receptáculo carnosos, el desarrollo de los aquenios da lugar al fruto de la fresa.

1.2 Principales enfermedades reportadas a nivel mundial.

El cultivo de frutilla al igual que otros cultivos comerciales puede presentar problemas fitosanitarios producidos por factores ambientales, genéticos y biológicos, lo cual puede provocar grandes pérdidas económicas a los productores. La planta de frutilla puede ser afectada por un gran número de enfermedades causadas por hongos, oomicetos, bacterias, virus, nemátodos y artrópodos; estos patógenos y plagas causan daños a toda la planta principalmente produciendo daños en las raíces, corona, peciolo, hojas y frutos, afectando principalmente su calidad, producción y rentabilidad debido que causa grandes pérdidas en la producción de la fruta (Husaini y Neri, 2016,p. 157-161).

Organismos fungosos del suelo: Los principales organismos fungosos que afectan al cultivo de frutilla son: *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp., *Neopestalotiopsis* sp., y *Verticillium* sp., afectando a la planta desde su sistema radical o zona cortical del cuello dando lugar a podredumbres. Algunos de ellos como *Rhizopus* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotinia* sp., *Penicillium expansum*, etc., estos principalmente afectan a los frutos después de ser cosechados, por lo que es conveniente almacenarlos a bajas temperaturas (Badenier,2015,p.38-52).

Enfermedades causadas por nemátodos

Los géneros de nemátodos que afectan principalmente al cultivo de frutilla son endoparásitos (*Meloidogyne* y *Pratylenchus*) estos se alimentan de las raíces ingresando completamente, y los ectoparásitos (*Xiphinema* y *Helicotylenchus*) son aquellos que se alimenta de las partes externas del sistema radicular sin la necesidad de ingresar en ellas directamente (Badenier,2016, citados en González, 2007,p. 48-50).

Tabla 2-1: Enfermedades causadas por nemátodos
en plantas de frutilla.

Enfermedad	Agente causal
Lesiones de la raíz	<i>Pratylenchus coffeae</i> <i>Pratylenchus penetrans</i> <i>Pratylenchus pratensis</i> <i>Pratylenchus scribneri</i>
Nudos de la raíz	<i>Meloidogyne</i> spp. <i>Meloidogyne hapla</i>

Fuente: Maas, 1998

Enfermedades causadas por Bacterias

Las bacterias se desarrollan en temperaturas de 20°C y una humedad relativa elevada, se manifiestan con la presencia de manchas translúcidas de aspecto aceitoso en el envés de las hojas, que conforme avanza la enfermedad, dichas manchas se van uniendo tomando una coloración necrótica (Badenier,2015,p.38-52).

Tabla 3-1: Enfermedades causadas por bacterias
en plantas de frutilla.

Enfermedad	Agente causal
Mancha angular de la hoja	<i>Xanthomonas fragariae</i>
Marchitez bacteriana	<i>Ralstonia solanacearum</i>

Fuente: Maas, (1998).

Enfermedades causadas por Virus

Tabla 4-1: Enfermedades causadas por virus en plantas de frutilla

Enfermedad	Agente causal
Virosis	<i>Strawberry Crinkle Virus (SCRV)</i> , <i>Strawberry Mild Yellow Edge Virus (SMYEV)</i>

	<i>Strawberry Mottle Virus (SMoV)</i>
--	---------------------------------------

Fuente: Raura, (2012).

1.3 Pudrición de la corona.

1.3.1 Síntomas asociados a la pudrición de corona

Los principales síntomas asociados con esta enfermedad son lesiones de coloración rojiza a café oscuro en el centro de la corona de las plantas, las cuales con el pasar el tiempo desencadenan una necrosis general, de manera que imposibilita el flujo de agua y nutrientes hacia la parte aérea de la planta, debido a la muerte de la corona, el follaje deja de recibir agua y se marchita para luego secarse (Morales et al.2017,p.48-61).

En países como Italia, en la provincia de Cuneo, se han reportado que plantas de frutilla cv. Portola han mostrado un colapso intensivo presentando síntomas como el lento crecimiento de las plantas observándose tejidos necróticos de color marrón anaranjado en las hojas basales, necrosis de los peciolo y finalmente la muerte de la planta (Gerin., et al. 2018).

Otro de los países con problemas de pudrición de corona en plantas de frutilla es México, en este país se le conoce con el nombre de secadera de la fresa, los principales síntomas que presentaron las plantas de frutilla fueron marchitamiento y muerte gradual de la planta (Ceja-Torres et al.,2018).

1.3.2. Organismos fungosos asociados a la pudrición de corona

Los organismos fungosos que están asociados principalmente a la pudrición de corona y raíz en las plantas de frutilla son los siguientes:

Armillaria mellea (Vahl:Fr.) P. Kumm, *Rosellinia necatrix* Prill, *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum* , *Fusarium solani*, *Verticillium* sp., *Phytophthora* sp., *P. cactorum* (Lebert y Cohn) J. Schröt., *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian, *P. megasperma* Drechs. (associated Calif. only) (Converse 1993).

Tabla 5-1: Principales organismos fúngicos, síntomas asociados a la pudrición de corona de las plantas de frutilla y países donde fueron reportados.

Organismos fúngicos	Lugar de reporte	Síntomas observados	Referencia
<i>Rhizoctonia solani</i>	Brasil	Disminución progresiva de crecimiento, enrojecimiento de folíolos, pecíolos y corredores, además de podredumbres secas del ápice de la corona, estípula y base de los pecíolos.	(Tanaka, Ito, y Passos, 1995)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Polonia	Marchitamiento de la planta	(Hetman, 2001)
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora</i> sp. <i>P. aphanidermatum</i> <i>Rhizoctonia fragariae</i>	México	Necrosis en raíz, corona y muerte general de las planta.	(Ceja et al., 2008)
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Argentina, Italia	Marchitez y clorosis de las hojas, corona y raíces con tejidos necróticos de una coloración rojo marrón a marrón oscuro del anillo vascular, toman una coloración oscura a nivel externo e interno, ennegrecimiento con varios esclerocios subepidérmicos oscuros, oblongos.	(Baino, Salazar, Ramallo y Kirschbaum, 2011) (Gerin, Dongiovanni, Angelini, Pollastro y Faretra, 2018)
<i>Fusarium solani</i>	España	Marchitez del follaje, retraso del crecimiento, secado de las plantas y la muerte de las hojas más viejas. Tejidos vasculares y corticales de la corona de la mostraron una decoloración de naranja a marrón.	(Pastrana, Capote, De los Santos, Romero y Basallote, 2014)
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	España, Italia	Decoloración o áreas necróticas de una coloración rojiza marrón en los tejidos internos de la corona y la raíz.	(Chamorro et al., 2016) (Sigillo, Ruocco, Gualtieri, Pane y Zaccardelli, 2019)

<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Vietnam Bangladés México	Secado de las plantas empezando desde el borde de las hojas y se extienden hacia la corona, hojas y flores completamente secas, color oscuro, en tallos y raíces coloración negra, la corona solo se vio ligeramente afectada. Las frutas presentaron crecimiento de antracnosis y micelios en el ápice y necrosis de los sépalos.	(Dung, Thi, Hoang y Ngoc, 2016) (Ara et al. 2017) (Morales et al., 2019)
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Bélgica	Necróticos en el eje de la hoja y en partes de la corona superior, podredumbre de la corona basal y un colapso generalizado de la planta.	(Van Hemelrijck, Ceustermans, Van Campenhout, Lieten y Bylemans, 2017)
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Estados Unidos	Síntomas de marchitez y decoloración de la corona de color marrón rojizo oscuro	(Marin et al. 2018)
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	Argentina Uruguay	Hojas necróticas rojizas en zonas intervenosas, con áreas de color óxido en las hojas más viejas, comenzando desde los márgenes y cubriendo toda la hoja a medida que se desarrolla la enfermedad, áreas necróticas y decoloración de las raíces y la corona, causando en la muerte de la planta.	(Obregón, Meneguzzi, Ibañez, Lattar y Kirschbaum, 2018) (Machín et al. 2019)
<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	Egipto, México	Secado del borde de las hojas a hojas completamente secas y decoloración de los tejidos internos de la corona, pudrición de raíz y corona.	(Essa, Kamel, Ismail y El-ganainy, 2018) (Rebollar et al. 2020)
<i>Fusarium oxysporum</i>	México, Ecuador	Marchitez vascular, amarillamiento y necrosis de raíces, decoloración externa e interna de los tallos y brotes muertos y disminución de la biomasa fresca y seca de las plantas y plantas muertas.	(Bárcenas, Guillén, Yazmín, Ramos y Valle, 2019) (Guevara et al. 2019)
<i>Neopestalotiopsis mesopotámica</i>	Ecuador	Manchas necróticas, necrosis en margen y ápice de hojas jóvenes avanzando hasta secar completamente las hojas y provocar un colapso	(Intriago et al., 2021), en revisión.

		general de la planta. En la corona se observó necrosis interna del tejido vascular de color pardo rojizo.	
--	--	---	--

Publicaciones relevantes de la Etiología de la Pudrición de corona en frutilla

Realizado por: Vallejo, A. 2021.

1.4.1 *Neopestalotiopsis* sp.

Generalidades

Neopestalotiopsis es un hongo que afecta a varios cultivos principalmente al cultivo de arándano, palma de aceite, guayaba y frutilla, este es un hongo que presenta una fase saprofítica; es decir, puede sobrevivir en tejidos muertos permitiéndole al hongo permanezca en las plantas muertas y puede diseminarse a otros cultivos por medio del viento, agua, el hongo forma acérvulos que son las estructuras que inician el proceso de infección estos aparecen por debajo de la cutícula del hongo para diseminar conidios, que son esporas asexuales, afectando así de esta manera las plantas, para el desarrollo de esta enfermedad su temperatura óptima es de 19 a 23 °C (Chamorro, et al,2016).

Taxonomía

Tabla 6-1: Taxonomía de *Neopestalotiopsis* sp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Xylariales
Familia	<i>Sporocadaceae</i>
Género	<i>Neopestalotiopsis</i>

Fuente: Schoch et al.,(2020).

Realizado por: Vallejo, A. 2021.

Morfología

Neopestalotiopsis es un hongo que presenta acérvulos de 280 µm, de color negro, concéntricos. Los conidios son fusiformes a elipsoides y de cinco células (promedio 22,7 ×

7,7 µm). Las células apicales y basales son hialinas, mientras que la tercera y cuarta célula de la base son más oscuras (marrón), la segunda célula de la base (marrón pálido). Los conidios presentan un apéndice basal (promedio de 9,5 µm) y de dos a cuatro apéndices apicales (promedio de 25,9 µm) desarrollándose a una temperatura de 25°C en medio PDA (Chamorro et al.,2016).

Chamorro et al.,(2016) menciona que en la provincia de Huelva, suroeste de España, el cultivo de frutilla presentó síntomas como: zonas necróticas de coloración marrón en la corona y raíz. El patógeno asociado a esta enfermedad fue aislado de material colectado de los campos en donde existían plantas sintomáticas, realizando cortes de la corona y raíces que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 minutos, enjuagadas dos veces con agua estéril y secadas al aire en un gabinete de flujo laminar, estas muestras se cultivaron en medio PDA a 25°C. Los aislados fueron identificados con diferentes metodologías como *Pestalotiopsis clavispora* Stevaert, recientemente renombrado como *Neopestalotiopsis clavispora* (Maharachchikumbura et al., 2014; citado en, Chamorro et al, 2016).

Dunga et al.(2016, p.367-374) menciona que para comprobar la capacidad de causar infección de este patógeno es necesario realizar las pruebas de patogenicidad, estas pruebas deben ser realizadas en las mismas variedades de donde fueron aisladas y con sustratos estériles, la cantidad de inóculo recomendado y la técnica de inoculación para observar los síntomas puede ser de 10⁷esporas/mL y aspersión de las esporas directamente en el sustrato. Los síntomas registrados después de la inoculación generalmente están asociados a secado de la parte aérea de las plantas de frutilla, comenzando desde el borde de las hojas, luego estas lesiones de las hojas se extienden progresivamente hasta la corona de las plantas, otro de los síntomas característicos observados es el secamiento total de hojas y flores, tronándose estos órganos y tejidos de color oscuro al igual que los tallos y raíces de las plantas.

1.4.2 *Fusarium* sp.

Generalidades

El género *Fusarium* es un grupo importante de hongos patógenos en la agricultura que causan un gran número de enfermedades en los cultivos. Este hongo para su propagación usa como nichos, el suelo, partes aéreas de las plantas y sustratos orgánicos, se desarrolla dependiendo de factores como el clima, la vegetación, el tipo de suelo, la humedad del suelo y fertilidad, encontrándose en forma abundante en suelos fértiles (Guevara ,2015,p.8-14).

Dentro de este género se ha descrito a *Fusarium oxysporum* que causa enfermedades en muchas especies de cultivos de importancia económica, puede sobrevivir durante largos períodos en la materia orgánica del suelo, *Fusarium oxysporum* penetra en la planta a través de las raíces colonizando la corteza de la raíz, presentando síntomas como lesiones en la corona de las plantas de color marrón-café, senescencia temprana de las hojas maduras y marchitamiento de toda la planta (Husaini, 2016,p. 157-167).

Taxonomía

Tabla 7-1: Taxonomía de *Fusarium* sp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia:	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>

Fuente: Guevara, (2015).

Realizado por: Vallejo, A. 2021

Morfología

Fusarium oxysporum

Presenta conidióforos hialinos, simples, cortos o poco diferenciados de las hifas, con masas de esporas en los ápices de dos tipos:

- **Macroconidios** con una dimensión de $29,1-45 \times 2.9-4,7 \mu\text{m}$, en forma de bote, con células apicales ligeramente ahusadas y células basales en forma de gancho, de 4 células.
- **Microconidios** con una dimensión de $6-15,8 \times 1.9-3,7 (-5) \mu\text{m}$ en forma elipsoidal, unicelular (Heitefuss, 2011,p. 273).

Células conidiógenas: Monofialides cortos y su micelio aéreo: se presenta en falsas cabezas (Leslie y Summerell,2006, p. 212-213).

Clamidosporas: $10,2-15 \mu\text{m}$ de diámetro, pueden ser marrones, globosas, generalmente solitario (Heitefuss, 2011,p. 273).

Fusarium tricinctum

Esta especie de hongo crece rápidamente y forma abundante micelio que inicialmente son blancas, pero que se vuelven rosadas, rojas o moradas con la edad.

- **Macroconidios:** son delgados y falcados a casi lunático, sus células apicales son de forma curvada y ahusada, sus células basales tienen forma de pie bien desarrollada, su número de septos es 3 pero ocasionalmente son de 4 a 5 tabiques.
- **Microconidios:** su forma se presenta en tabicación: napiforme, ovalada, piriforme y ocasionalmente citriforme, presenta pequeñas cabezas falsas con pocos microconidios que pueden estar agrupados y parecen un racimo de uvas, sus células conidiógenas son monofialides.

Clamidosporas: presentan un aspecto globoso con una pared exterior lisa que se vuelve de un color marrón con la edad (Leslie y Summerell, 2006, p. 268-269).

1.4 Patogenicidad.

La patogenicidad según Whetzel, 1929 se define como la habilidad de organismo de causar la enfermedad en las plantas, mientras que Milgrod, 1990 lo define como la descripción cualitativa de la interacción del patógeno con el hospedero; es decir, un microorganismo es patógeno siempre y cuando cause enfermedad.

1.5 Agresividad

Van der plank, 1963 la define como el grado de daño cuantitativo que un patógeno causa a las plantas. Por lo tanto, existen patógenos más o menos agresivos, y esta agresividad está relacionado con aspectos de la planta, el patógeno y el ambiente. Este término también es frecuentemente asociado con virulencia

1.7 Postulados de Koch

Estos postulados plantean la necesidad de la asociación constante de un agente biótico con el hospedero enfermo para comprobar la causalidad de una enfermedad con la presencia de ese agente biótico, para proceder luego a su aislamiento, su caracterización y su cultivo in vitro en ausencia de otros microorganismos. Una vez lograda esta segunda fase bajo condiciones axénicas, la inoculación de un hospedero sano con los propágulos de este microorganismo (células, esporas, etc.) debe reproducir y desencadenar el mismo cuadro patológico inicial, es decir, el mismo síndrome de la enfermedad con su típica sintomatología y alteraciones en el hospedero y, finalmente, los dos aislamientos del agente

biótico, el natural y el cultivado, deben coincidir en sus rasgos morfológicos y biológicos relevantes (Volcy, 2008,p. 108-109).

Agrios,(2005,p. 35-36) menciona que los postulados de Koch son:

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se ""examinen".
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características- (parásito no obligado) o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parásito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
4. El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Características del lugar

2.1.1 Localización

La investigación se realizó en algunas etapas: la etapa *in vitro*, reactivación de las cepas de hongos, experimentos de crecimiento, esporulación y germinación en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; mientras que, la etapa *in vivo* consistió en la realización de las pruebas de patogenicidad y agresividad localizado en el invernadero de la Estación Experimental Tunshi, ubicado en la parroquia Licto, cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.1.2 Ubicación geográfica

Coordenadas de la Estación experimental Tunshi

Latitud: 1°39'05.8" S

Longitud: 78°41'00.4" W

Altitud: 2735 msnm

Coordenadas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Latitud: 1°44'54" S

Longitud: 78°37'32" W

Altitud: 2834 msnm

2.2 Materiales y equipo

2.2.1 Material biológico

En la investigación se utilizaron los siguientes materiales:

- 200 Plantas de frutilla var. Albion de 18 meses de edad.

- Inóculo de hongos pertenecientes al complejo *F. oxysporum*
- Inóculo de hongos pertenecientes a *F. trincintum*
- Inóculo de hongos identificados como *Neopestalotiopsis* sp.

2.2.2 Medios de cultivo

- Papa dextrosa agar (PDA Difco™).
- Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA).
- Agar-Agar (AA BIOCEN).

2.2.3 Reactivos

- Estreptomina
- Chloranfenicol
- Hipoclorito de sodio 1%
- Alcohol 70%
- Agua destilada
- Lactofenol

2.2.4 Materiales del laboratorio

- Cajas de Petri de vidrio (90 mm Ø).
- Cajas de Petri de plástico.
- Frascos de tapa roscable azul (1000 mL).
- Matraz de Erlenmeyer (1000 mL).
- Puntas de micropipetas (1000 µL).
- Vasos de precipitación (100 mL).
- Mechero Bunsen.
- Micropipeta.
- Espátula de drigalski.
- Probeta (500 mL).
- Pinzas (200 mm).
- Agujas de disección.
- Placas porta y cubre objeto.
- Cámara fotográfica.

2.2.5 Equipos del laboratorio

- Cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X).
- Autoclave (BKQ-B100II).
- Microscopio óptico (SWIFT M10).
- Baño María (CENCO 97013-16).
- Destilador de agua (BOECO WS 8000).
- Ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450).
- Incubadora (J.P.SELECTA 2001249).
- Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2).
- Secador de vidrio (SELECTA 2000381).
- Cámara de recuento: neubauer-improved (8100204).

2.2.6 Material de campo

- Sensor temperatura y humedad relativa (HOBO®).
- Sustrato BM2.
- Cocina industrial de 4 quemadores.
- Cilindro de gas.
- Olla de aluminio.
- Taque plástico.
- Jarra de plástico.
- Jeringuillas (5 mL).
- Baldes plásticos.
- Insumos (fertilizantes e insecticidas).
- Libreta de apuntes.
- Cámara fotográfica.
- Rastrillo.
- Azadón.

2.2.7 Materiales de oficina

- Computadora.
- Impresora.
- Libreta de apuntes.

2.3. Métodos

2.3.1 Reactivación de los aislados de Fusarium sp. y Neopestaloptosis sp.

La reactivación de las cepas se realizó usando medio PDA marca Difco™, los aislados de los dos géneros de hongos fueron repicados e incubados a una temperatura de 28°C sin fotoperíodo, evaluando constantemente su crecimiento aproximadamente por unos 7 días hasta observar que los hongos llenen completamente las cajas Petri.

2.3.2 Preparación de suspensiones conidiales de Fusarium sp., y Neopestalotipsis sp., para la inoculación de plantas de frutilla

Para la preparación de las suspensiones conidiales de los hongos en estudio se utilizaron hongos crecidos en medio SNA e incubados a 28°C durante 15 días sin fotoperíodo, a los cuales se les añadió 10 mL de agua destilada estéril en cada caja de Petri. Inmediatamente se raspó la superficie del micelio con una espátula de drigalski hasta formar una suspensión de esporas. Se tomaron 200 µL de esta suspensión y a continuación se le agregó 100 µL de azul de metileno dejando en reposo por 10 min, finalmente se realizó el conteo de las esporas en la cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios/ mL.

2.3.3 Preparación de las plantas de frutilla

Para las pruebas de patogenicidad y agresividad se utilizó plantas de frutilla cv. Albión de 18 meses de edad, las cuales fueron trasplantadas utilizando sustrato BM2 estéril en fundas de polietileno (20 x 30 cm), las mismas que fueron mantenidas bajo invernadero. Se realizó un manejo cultural de las plantas las mismas que consistió en la poda de las plantas, el control de insectos, la nutrición mediante fertiriego, y otras actividades realizadas de acuerdo a las necesidades del cultivo. El agua utilizada para el riego y preparación de soluciones nutritivas fue previamente esterilizada (hervida) de esta manera se evitó la contaminación de las plantas con otros organismos patógenos externos.

2.3.4 Inoculación

Los aislados fúngicos fueron inoculados en plantas sanas de frutilla cv. Albión usando dos métodos de inoculación:

Método de Punción

Este método consistió en realizar una herida con una aguja estéril en la corona de las plantas de frutilla a 2 cm del sustrato, y posteriormente inyectar 5mL de la suspensión de inóculo a una concentración de 1×10^5 (conidios/mL) en la parte superior de la corona a los 2 cm del sustrato, directamente en la zona meristemática (Intriago, 2020).

Método de suspensión

Consistió en colocar alrededor de la corona de las plantas de frutilla una cantidad de 50 mL de la suspensión de inóculo a una concentración de 1×10^5 (conidios/mL) (Robles et al. 2014).

2.3.4 Determinación de parámetros asociados con agresividad: Índice de infección, área bajo la curva del progreso de la enfermedad y la severidad de pudrición para las plantas inoculadas con los hongos de *Neopestalotiopsis* sp y de *Fusarium* sp.

Para calcular el índice de infección se evaluó la intensidad de la enfermedad usando una escala de notas descriptivas de síntomas externos y aéreos adaptada de Pastrana et al.,(2017,p.1-5). La cual propone las siguientes notas para la sintomatología principalmente de la parte aérea: nota 1 (plantas sin síntomas), nota 2 (secado y muerte de las hojas más viejas), nota 3 (hojas viejas sintomáticas acompañadas de marchitez de hojas más jóvenes y/o retraso en el crecimiento), nota 4 (síntomas severos de la hojas y ennegrecimiento del tallo), nota 5 (plantas muertas).

A partir de esos resultados el índice de infección fue calculado según la metodología propuesta por McKinney, H.H, 1923. Posteriormente con los datos obtenidos del índice de infección se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para cada tratamiento utilizando la metodología de integración trapezoidal Shaner.,(1977,p. 1052). Para la evaluación de la severidad de la pudrición (síntomas internos) de las plantas inoculadas con los diferentes aislados, fueron llevadas plantas de frutilla de los diferentes tratamientos para el laboratorio de Fitopatología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, y se procedió a lavar las plantas completamente, luego se realizaron cortes transversales observando la zona necrosada de la corona, estos cortes se ubicaron en un fondo de color azul para fotografiarlas y procesarlas posteriormente mediante el uso del software Assess 2.0 (The American Phytopathological Society,2008).

2.3.5 Germinación, esporulación y tasa de crecimiento micelial

Germinación y esporulación

La esporulación de los diferentes aislados fúngicos se evaluó usando medio SNA. Los hongos fueron crecidos a 28°C durante 7 días, en ausencia de fotoperíodo, posteriormente las cajas de Petri con los hongos en estudio fueron colocadas bajo lámparas de luz blanca bajo un ciclo de 48 h de luz. Finalmente, las cajas de Petri de los aislados fúngicos fueron colocadas a temperatura ambiente y en presencia de luz solar para inducir la esporulación durante 7 días.

Después de este período para evaluar la germinación de las esporas, se colocó en cada caja de Petri una cantidad de 2 mL de agua destilada estéril y se procedió suavemente a raspar con la espátula de drigalsky durante unos 20 s, inmediatamente se tomaron 100 µL de la suspensión de esporas, colocando dicha suspensión en una placa porta objeto dentro de un tarrina con papel toalla estéril húmedo, se procedió a tapar y colocar en la incubadora a una temperatura de 25°C por el lapso de 24 h. Después de este período las placas fueron retiradas de la incubadora y en cada una se colocó una gota de lactofenol, finalmente se colocó un cubre objetos en cada placa. La germinación de las esporas fue evaluada contando 100 conidios (microconidios en el caso de *Fusarium* sp., y conidios en el caso de *Neopestalotiopsis* sp.) al azar de cada placa. La espóra se consideró germinada cuando la longitud de la hifa germinativa superaba la longitud de la espóra.

Para determinar la esporulación, después del periodo de incubación de los cultivos a 25°C y posteriormente a la exposición de luz artificial y solar, se colocó en cada caja de Petri una cantidad de 2 mL de agua destilada estéril y se procedió suavemente a raspar con la espátula de drigalsky durante unos 20 s, inmediatamente se tomaron 10 µL de la suspensión de esporas, colocando dicha suspensión en la cámara de Neubauer. La esporulación de cada hongo fue evaluada mediante el conteo de las esporas en la cámara de Neubauer y según el factor de corrección fue calculado el número de esporas/mL.

Tasa de crecimiento micelial

Para la determinación del crecimiento micelial de los dos géneros de hongos, fueron usados dos medios de cultivos: PDA y SNA. Los hongos fueron repicados en los medios de cultivo antes mencionados e incubados durante 7 días a temperaturas de 25°C y 30°C en ausencia de fotoperíodo. El diámetro micelial fue medido en sentido horizontal y vertical a las 48, 96, 120, 144 y 264 h.

2.3.6 Re-aislamiento de agentes fúngicos

Procesamiento de muestras en laboratorio

Las plantas de frutilla de cada uno de los tratamientos que mostraron síntomas de pudrición de corona, fueron llevadas al laboratorio para el procesamiento de las muestras, cada una de las plantas fueron lavadas con agua hasta retirar todo el sustrato adherido al sistema radicular. Posteriormente la corona fue cortada en forma transversal obteniendo aproximadamente cortes de 1 cm², estos fragmentos fueron lavados, desinfectados con alcohol al 70% durante 1 min, luego se colocó en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 min., y finalmente se realizó tres enjagües con agua destilada estéril durante 40 s. cada vez.

Posteriormente se realizaron cámaras húmedas, colocando 3 fragmentos de tejidos desinfectados en papel filtro estéril en el interior de cajas de Petri, humedeciéndolas con agua destilada estéril. Finalmente, las cámaras húmedas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad durante 8 días.

Al observar el micelio crecido en los tejidos colocados en las cámaras húmedas, se procedió a transferir con agujas de disección una cantidad de micelio a cada una de las cajas de Petri con medio PDA, estas cajas fueron selladas, etiquetadas y se colocaron en la incubadora a 25 °C en oscuridad durante 15 días evaluando constantemente su crecimiento.

2.3.7 Diseño experimental

Experimento in vivo

Para la evaluación de la patogenicidad y agresividad de las plantas de frutilla, los factores de estudio fueron: Índice de infección y severidad de pudrición, en donde se utilizó un diseño de bloques completos al azar factorial en donde los factores fueron los métodos de inoculación (punción y suspensión) y los aislados fúngicos (*Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp.). Por cada tratamiento se utilizó 4 repeticiones (bloques), y cada repetición de cada tratamiento estuvo constituida por 5 plantas dando un total de 180 plantas de frutilla en todo el experimento.

Tabla 8-2: Tratamientos establecidos para experimento *in vivo* (invernadero).

Tratamientos	Método de inoculación	de	Aislado Fúngico	Concentración
T1	Inyección corona	de	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T2	Suspensión		<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T3	Inyección corona	de	<i>F. oxysporum</i>	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T4	Suspensión		<i>F. oxysporum</i>	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T5	Inyección corona	de	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2.	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T6	Suspensión		<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2.	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T7	Inyección corona	de	<i>F. tricinctum</i>	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T8	Suspensión		<i>F. tricinctum</i>	$1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$
T9	Testigo			

Realizado por: Vallejo, A., 2021.

Experimento *in vitro*

Para determinar la agresividad potencial de los aislados en estudio se hicieron los siguientes experimentos:

Tasa de crecimiento micelial:

En este se usó un diseño completo al azar factorial en donde los factores analizados fueron los hongos inoculados, medios de cultivo y la temperatura de crecimiento. Para este experimento se usó 4 repeticiones, cada repetición estaba constituida por una caja de Petri.

Tabla 9-2: Tratamientos establecidos para la evaluación de la tasa de crecimiento micelial.

Tratamiento	Aislado fúngico	Medio de cultivo	Temperatura °C
1	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	PDA	25
2	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	SNA	25
3	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	PDA	25
4	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	SNA	25
5	<i>F. oxysporum</i>	PDA	25
6	<i>F. oxysporum</i>	SNA	25

7	<i>F. tricinctum</i>	PDA	25
8	<i>F. tricinctum</i>	SNA	25
9	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	PDA	30
10	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	SNA	30
11	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	PDA	30
12	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	SNA	30
13	<i>F. oxysporum</i>	PDA	30
14	<i>F. oxysporum</i>	SNA	30
15	<i>F. tricinctum</i>	PDA	30
16	<i>F. tricinctum</i>	SNA	30

Realizado por: Vallejo, A., 2021.

Esporulación

Para este experimento se usó un diseño completo al azar en donde los tratamientos analizados fueron los hongos inoculados. Para este experimento se usó 4 repeticiones y cada repetición estaba constituida por una caja de Petri.

Tabla 10-2: Tratamientos establecidos para la evaluación de la esporulación de los aislados fúngicos.

Tratamiento	Aislado fúngico	Repeticiones
1	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	4
2	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	4
3	<i>F. oxysporum</i>	4
4	<i>F. tricinctum</i>	4

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Germinación

Para este experimento se usó un diseño completo al azar en donde los tratamientos analizados fueron los hongos inoculados. Para este experimento se usó 4 repeticiones, cada repetición estaba constituida por una caja de Petri.

Tabla 11-2: Tratamientos establecidos para la evaluación de la germinación de los aislados fúngicos.

Tratamiento	Aislado fúngico	Repeticiones
1	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	4
2	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	4
3	<i>F. oxysporum</i>	4
4	<i>F. tricinctum</i>	4

Realizado por: Vallejo, A., 2021

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

3.1 Resultado y discusión

3.1.1 *Evaluación cualitativa de los síntomas causados por Neopestalotiopsis sp., y Fusarium sp.*

Al realizar la inoculación de las plantas de frutilla var. Albión de 18 meses de edad, los primeros síntomas externos observados fueron manchas necróticas en el envés de las hojas, estos síntomas se observaron a los 3 días después de la inoculación de las dos cepas de *Neopestalotiopsis sp.*, con el método de punción. Al transcurrir el tiempo estas manchas fueron creciendo y avanzado desde el borde de las hojas hacia el interior de las mismas, ocasionando un secamiento progresivo de las hojas (Fig. 1b, c-3). Además se observó un oscurecimiento de los peciolos (Fig. 1d-3) en las plantas de frutilla inoculadas por el mismo método. En las plantas inoculadas con las dos cepas de *Neopestalotiopsis sp.*, mediante el método de suspensión, se observaron síntomas externos asociados con pequeñas manchas necróticas en el haz de las hojas (Fig. 2-3) a los 26 días después de la inoculación.

Los síntomas internos se observaron a nivel de la corona de las plantas de frutilla al momento de realizar un corte transversal, evaluando el nivel de necrosamiento (muerte de tejidos) que cada una de las plantas de los diferentes tratamientos presentó a nivel de la corona. Las plantas de frutilla inoculadas con las 2 cepas de *Neopestalotiopsis sp.*, por el método de punción presentaron aproximadamente un 90% de necrosamiento a nivel de la corona (Fig. 3a-3), el mismo que estaba caracterizado por un oscurecimiento progresivo de los tejidos de la corona de color marrón, por otro lado, las plantas de frutilla inoculadas con las 2 cepas de *Neopestalotiopsis sp.*, mediante el método de suspensión presentaron un 30% de necrosamiento a nivel de corona (Fig. 3b-3), caracterizado de la misma manera por el oscurecimiento de los tejidos de color marrón a café oscuro.



Figura 1-3: Síntomas causados por *Neopestalotiopsis* sp. (a) manchas necróticas, (b–c) hojas secas y enrolladas, (d) ennegrecimiento del peciolo, (e-f) marchitamiento foliar de la planta.

Realizado por: Vallejo, A., 2021



Figura 2-3. Sintomatología externa de las plantas inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp., mediante el método de suspensión.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

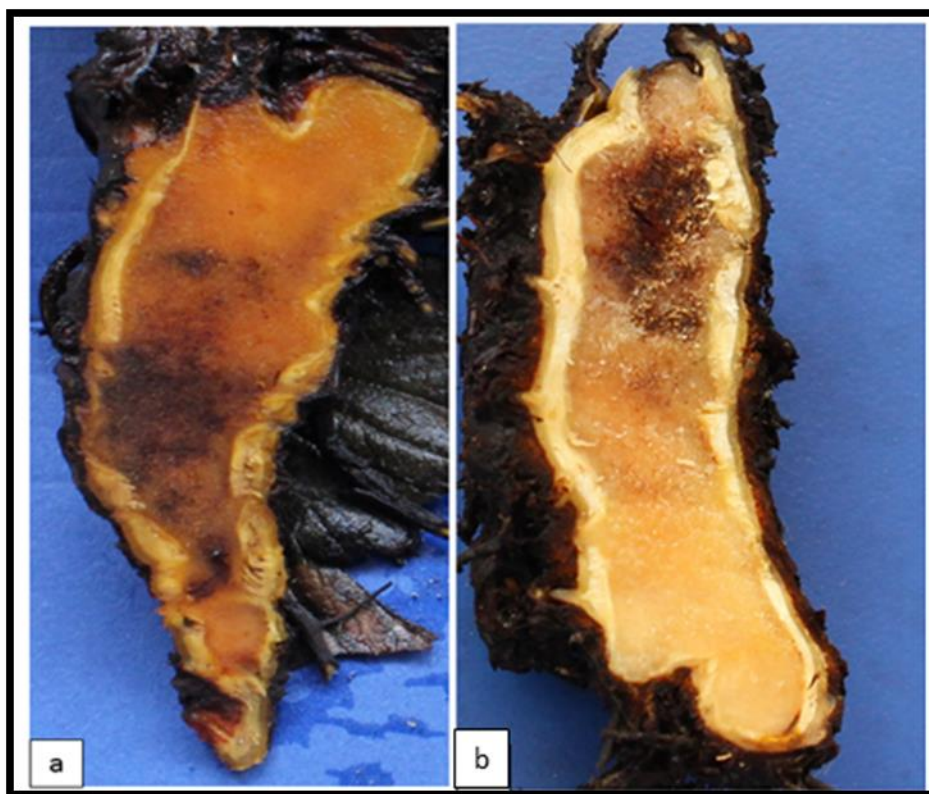


Figura 3-3: Síntomas internos inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp.

(a) necrosamiento de la corona por el método de puncion,

(b) necrosamiento de la corona por en el método de suspensión.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

En las plantas de frutilla inoculadas con las dos cepas de *Neopestalotiopsis* sp., usando el método de punción, se observó un marchitamiento inicial del área foliar de aproximadamente el 50% (Fig.1f-3), marchitamiento que fue avanzado en todas las plantas hasta que a los 45 días después de la inoculación se observó la muerte de las plantas inoculadas.

Todas las plantas inoculadas con los aislados fúngicos del género *Fusarium* sp., usando ambos métodos (punción y suspensión), no presentaron en el invernadero ningún síntoma de la enfermedad a nivel del área foliar hasta los 45 días después de la inoculación (Fig.4-3). Posteriormente, las plantas fueron llevadas al laboratorio, lavadas y procesadas según el apartado 2.3.6 de la metodología, observándose niveles bajos de necrosis de los tejidos de corona para todas las plantas inoculadas con las diferentes especies de *Fusarium* sp., y métodos de inoculación (Fig. 5-3 y ANEXO G).



Figura 4-3: Plantas de frutilla inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* sp.

(a-b) Plantas inoculadas con *F. oxysporum*, (c-d) Plantas inoculadas con *F. tricinctum*.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

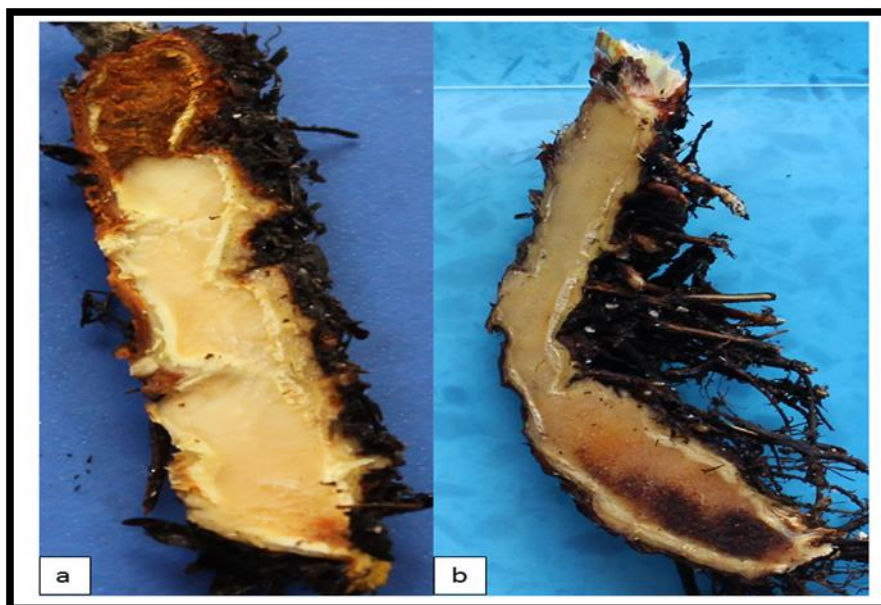


Figura 5-3: Tejidos internos de la corona de plantas de frutilla inoculadas

con diferentes especies de *Fusarium* sp., (a) corona inoculada con *F. oxysporum*, (b) corona inoculada con *F. tricinctum*.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

3.1.2 Índice de infección

Las plantas de frutilla inoculadas por el método de punción con la cepa 2 de *Neopestalotiopsis* sp., presentó un mayor índice de infección final con un promedio de $77,5 \pm 5\%$ a los 27 días después de la inoculación, mientras tanto que para las plantas de frutilla inoculadas por el mismo método con la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp, se observó un índice de infección final promedio del $70 \pm 10\%$ (ANEXO H).

Las plantas de frutilla inoculadas por el método de suspensión con la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., se observó un índice de infección final promedio de $1,25 \pm 2,5\%$, mientras que para las plantas inoculadas por el mismo método con la cepa 2 de *Neopestalotiopsis* sp. se observó un índice de infección de 0% (ANEXO H).

Para las plantas inoculadas usando los métodos de punción y suspensión con las dos especies de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. tricinctum*) el índice de infección final promedio observado fue de 0% .

3.1.3 Curva de progreso de la enfermedad

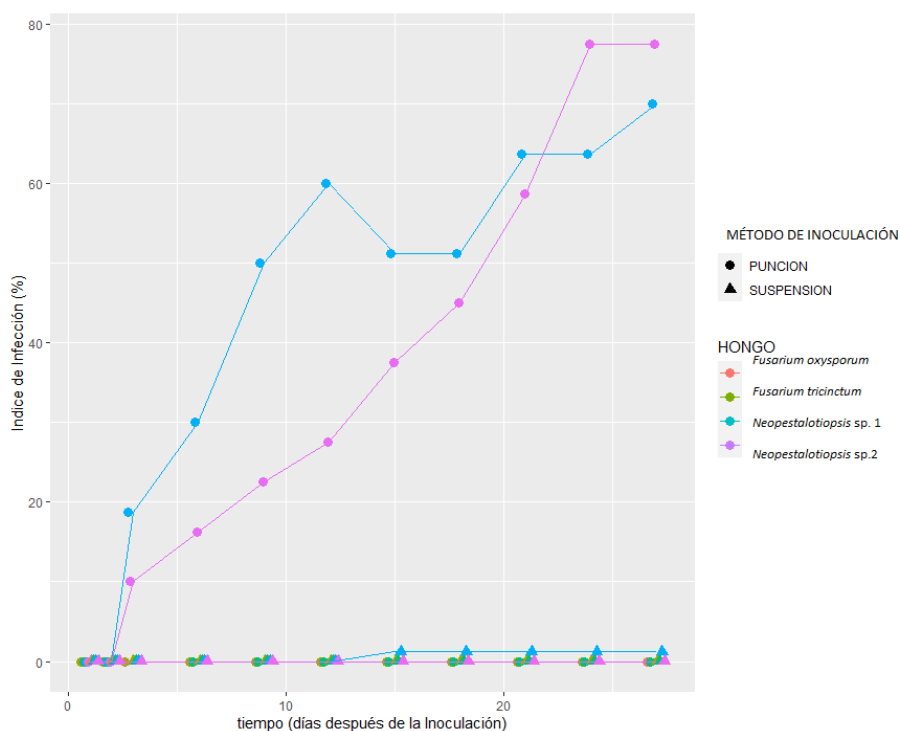


Gráfico 1-3: Curva del progreso de enfermedad de los aislados fúngicos

Neopestalotipsis sp., y *Fusarium* sp.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 12-3: Análisis de varianza para el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad

Cuadro del análisis de varianza					
	GL	SQ	CM	Fc	Pr>Fc
Bloque	3	36578	12193	1,868	0,15889
Hongos inoculados	4	2049029	512257	78,470	0,0001
Métodos de inoculación	1	1185941	1185941	18,668	0,0001
Hongos*Métodos	4	2009913	502478	76,972	0,0001
Error	27	176258	6528		
Total	39	5457719			

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 13-3: Test de Tukey para el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad para plantas inoculadas por el método de punción

Test de Tukey	
Hongos	Área bajo la curva
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	1101,25 a ¹
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cepa 1	637,50 b
<i>Fusarium oxysporum</i>	0 c
<i>Fusarium tricinctum</i>	0 c

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el

Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 14-3: Test de Tukey para el Área bajo la curva del progreso de la enfermedad para plantas inoculadas por el método de suspensión

Test de Tukey	
Hongos	Área bajo la curva
<i>Fusarium oxysporum</i>	0 a ¹
<i>Fusarium tricinctum</i>	0 a
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	16,875 b
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	0 a

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Para el área bajo la curva del progreso de la enfermedad calculado con los índices de infección de cada uno de los tratamientos, existió un efecto significativo de los hongos inoculados y métodos de inoculación ($P < 0,05$) (Tabla 1-3).

Para el método de inoculación de punción se observó la mayor área bajo la curva del progreso de la enfermedad cuando las plantas de frutilla fueron inoculadas con las cepas 2 y 1 de *Neopestalotiopsis* sp., con valores promedios de $1101,25 \pm 99,28$ y $637,5 \pm 244,84$ respectivamente. Por otro lado, las menores áreas bajo la curva fueron observadas para este método cuando las plantas fueron inoculadas con las dos especies de *Fusarium* spp. (*F. oxysporum* y *F. tricinctum*) (Tabla 2-3).

Para el método de suspensión se observó que la mayor área bajo la curva del progreso de la enfermedad fue obtenida cuando las plantas de frutilla fueron inoculadas con la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp, con un valor promedio de $16,875 \pm 33,75$. Por otro lado los menores valores de área bajo la curva fueron obtenidos para este método cuando las plantas fueron inoculadas con la cepa 2 de *Neopestalotiopsis* sp. y las dos especies de *Fusarium* spp. (*F. oxysporum* y *F. tricinctum*) (Tabla 3-3).

3.1.4 Evaluación de la severidad de la pudrición de la corona en plantas de frutilla.

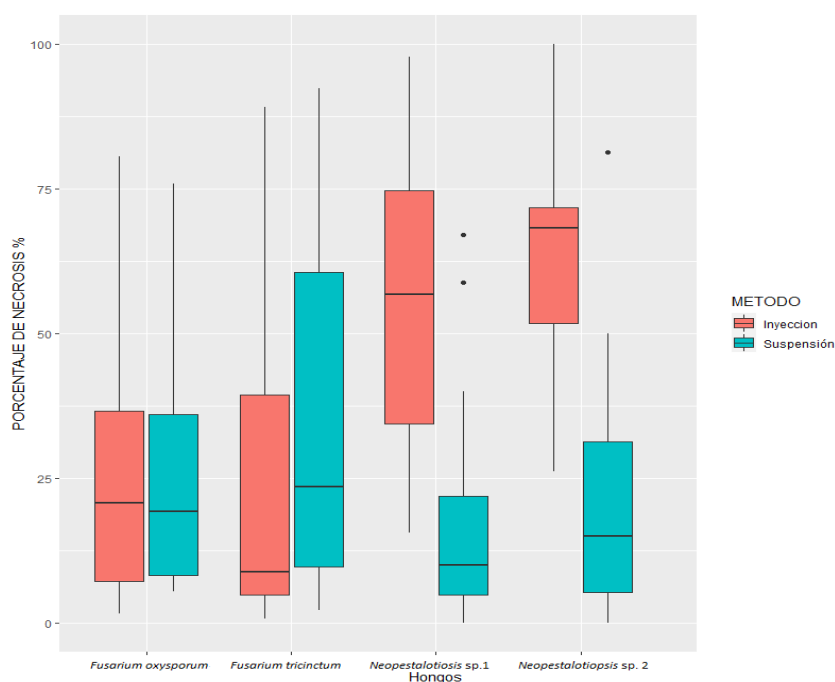


Gráfico 2-3: Evaluación de la severidad de la pudrición de plantas de frutilla

inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp., y *Fusarium* sp.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 15-3: Análisis de varianza de la severidad de la pudrición de la corona de plantas de frutilla.

Cuadro del análisis de varianza					
	GL	SQ	CM	Fc	Pr>Fc
Bloque	3	881,4	293,79	3,1251	0,047555
Hongos inoculados	3	1353,8	451,27	4,8003	0,010637
Métodos de inoculación	1	2106,1	2106,08	22,4028	0,000113
Hongos*Método	3	4725,4	1575,13	16,755	0,000009
Error	21	1974,2	94,01		
Total	31	11040,9			

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 16-3: Test de Tukey dentro del nivel método de punción de la severidad de la pudrición de corona de plantas de frutilla.

Test de Tukey	
Hongos inoculados	Porcentaje de severidad de la pudrición de la corona
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	63,11 a ¹
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	55,35 a
<i>Fusarium oxysporum</i>	24,28 b
<i>Fusarium tricinctum</i>	24,12 b

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 17-3: Test de Tukey dentro del nivel método de suspensión de la severidad de la pudrición de corona de plantas de frutilla.

Test de Tukey	
Hongos inoculados	Porcentaje de severidad de pudrición de corona
<i>Fusarium tricinctum</i>	38,72 a ¹
<i>Fusarium oxysporum</i>	24,74 ab
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	21,43 ab
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	17,07 b

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Para la variable de la severidad de la pudrición de la corona de plantas de frutilla obtenida mediante el análisis de imágenes usando el software Assess 2,0, existió un efecto de los factores en estudio: hongos inoculados y métodos de inoculación ($P < 0,05$) (Tabla 4-3).

Para el método de inoculación de punción se observaron los mayores porcentajes de pudrición de la corona en plantas de frutilla, cuando las plantas fueron inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp., cepa 2 y *Neopestalotiopsis* sp., cepa 1, con porcentajes promedios de pudrición de $62,76 \pm 19,07 \%$ y $55,03 \pm 22,74 \%$ respectivamente. Por otro lado, los menores porcentajes promedios de pudrición de la corona para este método fueron obtenidos cuando a las plantas se las inoculó con las dos especies de *Fusarium* spp. (*F. oxysporum* y *F. tricinctum*) (Tabla 5-3).

Para el método de inoculación de suspensión se observaron los mayores porcentajes de pudrición de la corona en plantas de frutilla, cuando estas fueron inoculadas con *F. tricinctum* con un valor promedio de pudrición de $38,11 \pm 31,88\%$, con *F. oxysporum* con un valor promedio de pudrición de $24,74 \pm 19,72\%$ y con la cepa 2 de *Neopestalotiopsis* sp. con un valor promedio de pudrición de $21,43 \%$ (Tabla 6-3).

1.1.1 Crecimiento micelial de los aislados fúngicos de *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp.

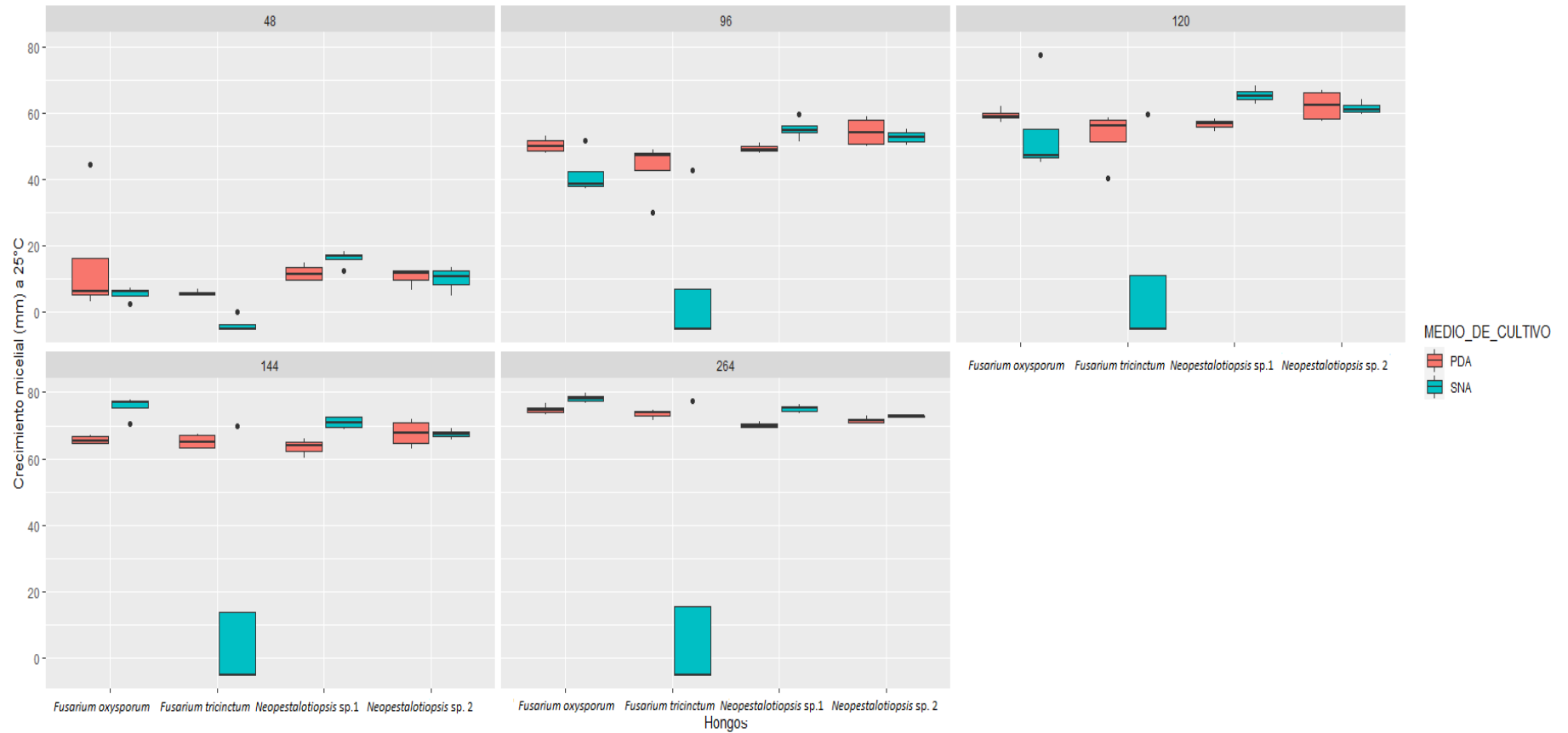


Gráfico 3-3: Crecimiento micelial en medio PDA y SNA de *Fusarium* sp., y *Neopestalotiopsis* sp., a una temperatura de 25°C.

Realizado

por:

Vallejo,

A.,

2021

Para las dos especies de *Fusarium* sp., el mayor valor promedio de crecimiento micelial diametral a las 48 h fue *Fusarium oxysporum* en el medio PDA con un valor de $15,11 \pm 19,69$ mm, mientras tanto a las 48 h la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., tuvo un mayor valor promedio de crecimiento micelial diametral en el medio SNA con un valor de $16,22 \pm 2,66$ mm y con un menor promedio se observó a la cepa 2 de *Neopestalotiopsis* sp., en medio SNA con un valor de $9,97 \pm 3,78$ mm; A las 96 h en PDA *F. oxysporum* presentó un mayor promedio de crecimiento micelial con un valor de $50,22 \pm 2,34$ mm y con un menor promedio de crecimiento micelial *F. tricinctum* en medio SNA con un valor de $6,90 \pm 23,80$ mm, la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., presentó un mayor crecimiento en medio SNA con un valor de $55,18 \pm 3,42$ mm y con un menor promedio de crecimiento micelial la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp. con un valor de $49,29 \pm 1,39$ mm; a las 120 h, *F. oxysporum* presentó el promedio mayor con un valor de $59,39 \pm 1,90$ mm en medio PDA, y con un menor promedio *F. tricinctum* en medio SNA con un valor de $11,18 \pm 32,36$ mm, la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., en medio SNA presentó el promedio mayor de crecimiento micelial con un valor de $65,30 \pm 2,28$ mm y con un menor promedio de crecimiento micelial la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., en medio PDA con un valor de $56,62 \pm 1,75$ mm; a las 144 h de incubación *F. oxysporum* mostró un mayor crecimiento en medio SNA con un valor de $75,69 \pm 3,42$ mm y con un menor promedio *F. tricinctum* en medio SNA con un valor de $13,69 \pm 37,37$ mm. Por otro lado la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., presentó un crecimiento micelial mayor en medio SNA con un valor de $70,84 \pm 1,99$ mm y con un menor promedio la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., en medio PDA con un valor de $63,52 \pm 2,50$ mm; finalmente a las 264 h *F. oxysporum* presentó un mayor promedio de crecimiento micelial en medio SNA con un valor de $78,18 \pm 1,39$ mm y con un menor promedio *F. tricinctum* en medio SNA con un valor de $15,59 \pm 41,17$, entre las cepas de *Neopestalotiopsis* sp, el hongo con un mayor crecimiento micelial en este tiempo fue *Neopestalotiopsis* sp., cepa 1 en SNA con un valor de $75,03 \pm 1,23$ mm y con un valor menor la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., sembradas en PDA con un valor de $70,02 \pm 0,94$ mm. De manera general el mayor crecimiento micelial fue obtenido por *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* sp., cepa 1 cultivadas en medio SNA a una temperatura de 25°C en todos los tiempos analizados (Gráfico 3-3).

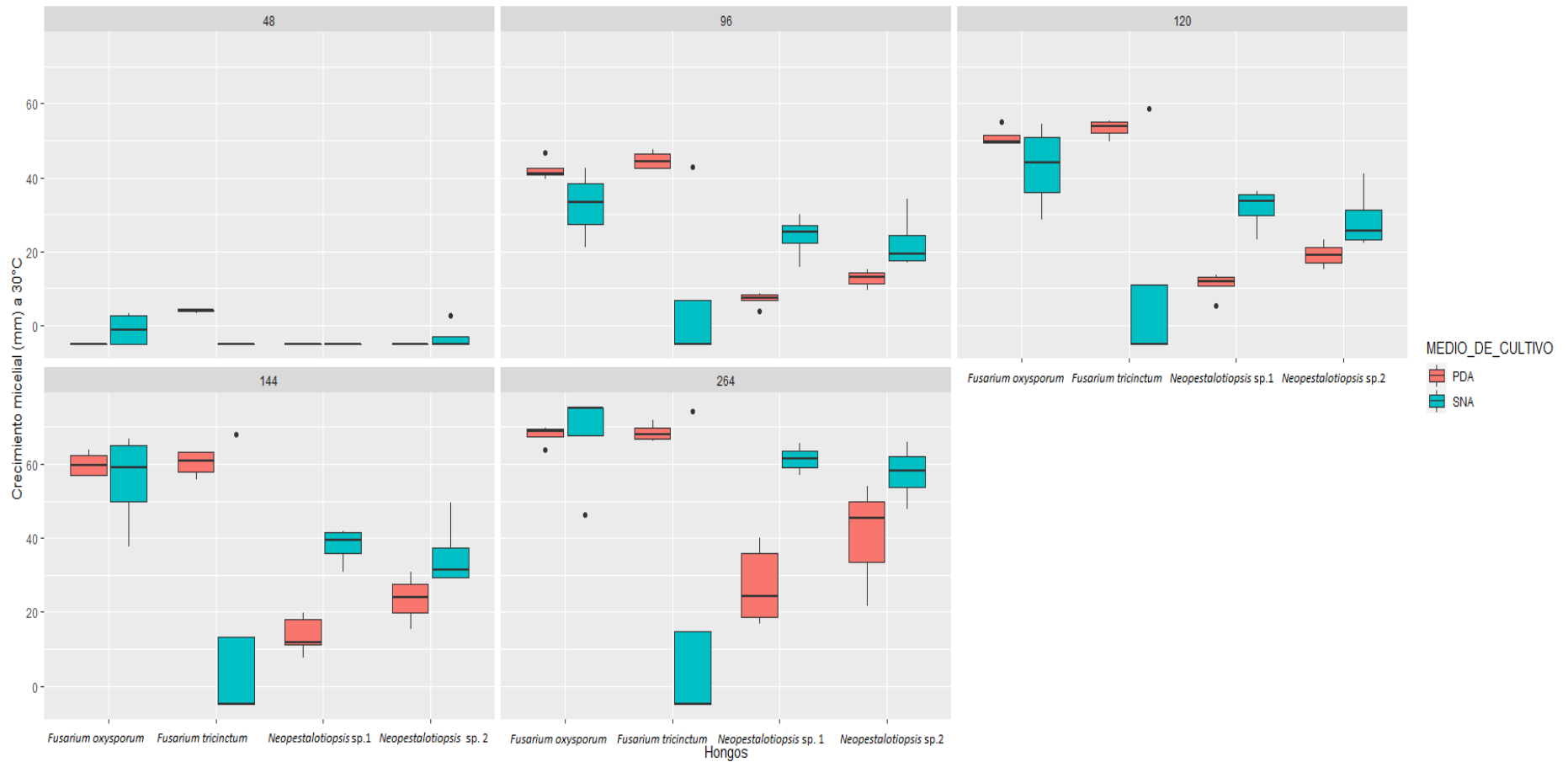


Gráfico 4-3: Crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, y *Neopestalotiopsis sp.*, a una temperatura de 30°C.

Realizado

por:

Vallejo,

A.,

2021

Para las dos especies de *Fusarium* sp., el mayor crecimiento micelial a las 48h fue para *F. tricinctum* en medio PDA con un valor de $3,94 \pm 0,53$ mm mientras tanto la cepa X de *Neopestalotiopsis* sp., no presentó crecimiento en ningún medio de cultivo, a las 96 h de incubación. En medio PDA *F. tricinctum* presentó un mayor crecimiento micelial con un valor de $44,65 \pm 2,70$ mm y *F. tricinctum* presentó el menor crecimiento micelial en medio SNA con un valor de $6,95 \pm 23,90$ mm. La cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., presentó el mayor crecimiento en medio SNA con un valor de $24,12 \pm 5,93$ mm y el menor crecimiento en medio PDA con un valor con un valor de $6,88 \pm 2,09$ mm. A las 120h con el mayor crecimiento micelial de $53,21 \pm 2,59$ mm fue *F. tricinctum* en medio PDA, y con el menor promedio de crecimiento micelial de *F. tricinctum* en medio SNA con un valor de $10,94 \pm 31,87$ mm. La cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., en medio SNA presentó el promedio mayor de crecimiento micelial con un valor de $31,57 \pm 5,90$ mm y con el menor promedio de crecimiento micelial la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., en medio PDA con un valor de $10,64 \pm 3,83$ mm; A las 144 h de incubación *F. tricinctum* mostró el mayor crecimiento en medio PDA con un valor de $60,21 \pm 3,66$ mm y con el menor promedio *F. tricinctum* en medio SNA con un valor de $13,28 \pm 36,56$. La cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., mostró el promedio mayor de crecimiento en medio SNA con un valor de $37,91 \pm 5,05$ mm y el menor promedio en medio PDA con un valor de $14,13 \pm 5,71$ mm; finalmente a las 264 h de incubación *F. tricinctum* presentó el mayor promedio de crecimiento en medio PDA con un valor de $68,52 \pm 2,57$ mm y el menor promedio en SNA con un valor de $14,86 \pm 39,72$ mm, entre las cepas de *Neopestalotiopsis* sp., el hongo con el mayor crecimiento micelial promedio fue la cepa 1 en SNA con un valor de $61,44 \pm 3,76$ mm y con el menor crecimiento micelial la cepa 1 en PDA con un valor de $29,71 \pm 10,04$ mm. De manera general el mayor crecimiento micelial fue observado cuando *F. oxysporum* fue cultivado en los dos medios (PDA y SNA) y la cepa 1 *Neopestalotiopsis* sp., fue cultivada en medio SNA a una temperatura de 30°C (Gráfico 4-3).

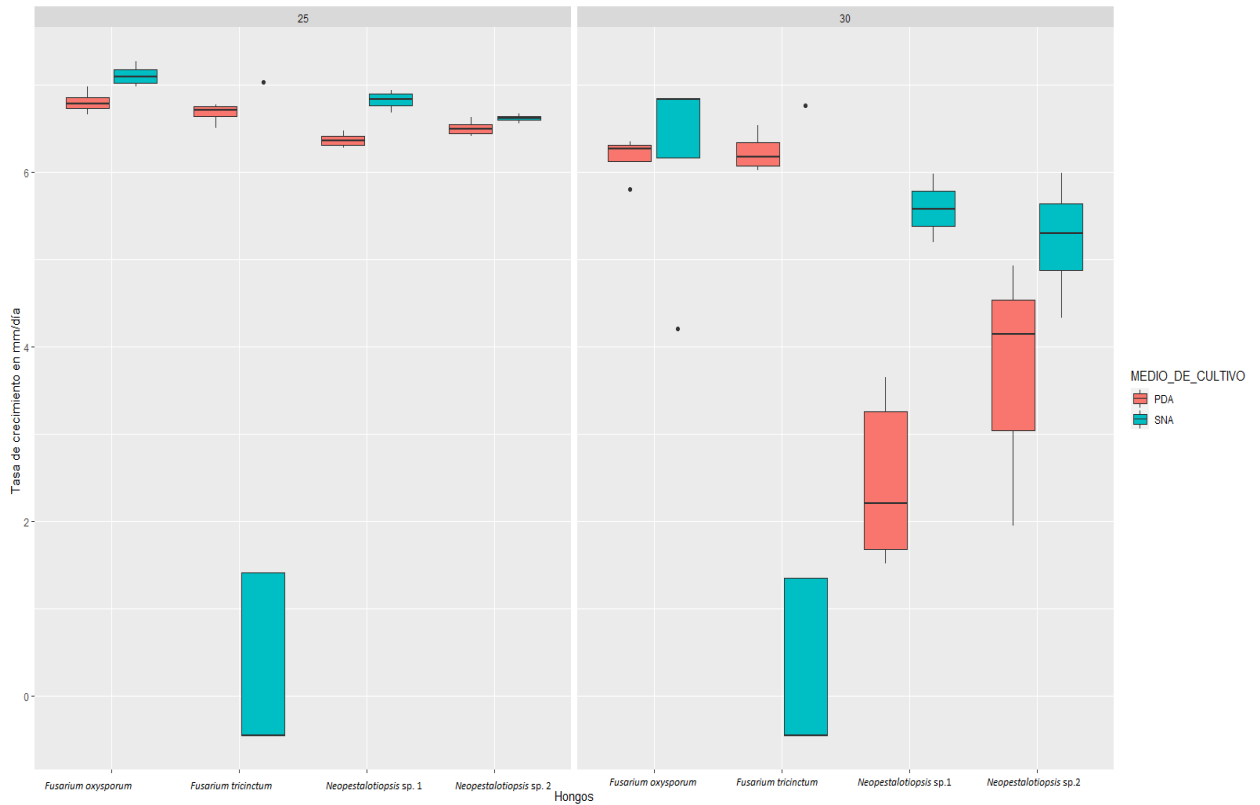


Gráfico 5-3: Tasa de crecimiento micelial en medio PDA y SNA a una temperatura de 25°C y 30°C de *Fusarium* sp., y *Neopestalotiopsis* sp.

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 18-3: Análisis de varianza de la tasa de crecimiento micelial.

Cuadro del análisis de varianza					
	GL	SQ	CM	Fc	Pr>Fc
Hongos	3	58,16597	19,38866	9,5825	0,0001
Medios de cultivos	1	4,8575	4,8575	2,4007	0,1278
Temperaturas	1	33,72338	33,72338	16,6673	2,00E-04
Hongos* Medios de cultivos	3	115,72264	38,57421	19,0647	0,0001
Hongos* Temperaturas	3	14,80305	4,93435	2,4387	0,0759
Medios de cultivo * Temperaturas	1	4,48039	4,48039	2,2144	0,1433
Hongos *Medio de cultivos*Temperaturas	3	5,14849	1,71616	0,8482	0,4744
Error	48	97,11989	2,02333		
Total	63	334,0213			

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 19-3: Test de Tukey para la tasa de crecimiento micelial en medio PDA

Test de Tukey	
Hongos	Tasa de crecimiento micelial (mm/día)
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,48 a ¹
<i>Fusarium Tricinctum</i>	6,45 a
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	5,29 ab
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	4,19 b

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Tabla 20-3: Test de Tukey para la tasa de crecimiento micelial en medio

SNA

Test de Tukey	
Hongos	Tasa de crecimiento micelial (mm/día)
<i>Fusarium oxysporum</i>	6,64 a ¹
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	6,20 a
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	5,92 a
<i>Fusarium Tricinctum</i>	1,38 b

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo, A., 2021

Para la variable de la tasa de crecimiento micelial, existió un efecto de los hongos en estudio y de los medios de cultivos utilizados ($P > 0,05$) (Tabla 7-3).

Para el crecimiento micelial en medio PDA se observó la mayor tasa de crecimiento micelial para *F. oxysporum* con un valor de 6,48 mm/día y *F. tricinctum* con un valor de 6,45 mm/día (Tabla 8-3). Para el crecimiento micelial en medio SNA se observó la mayor tasa de crecimiento micelial para *F. oxysporum* con un valor de 6,24 mm/día y la cepa1 de *Neopestalotiopsis* sp, con un valor de 6,20 mm/día (Tabla 9-3).

1.1.2 Germinación y esporulación de los aislados fúngicos

1.1.2.1 Germinación de los aislados fúngicos *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp.

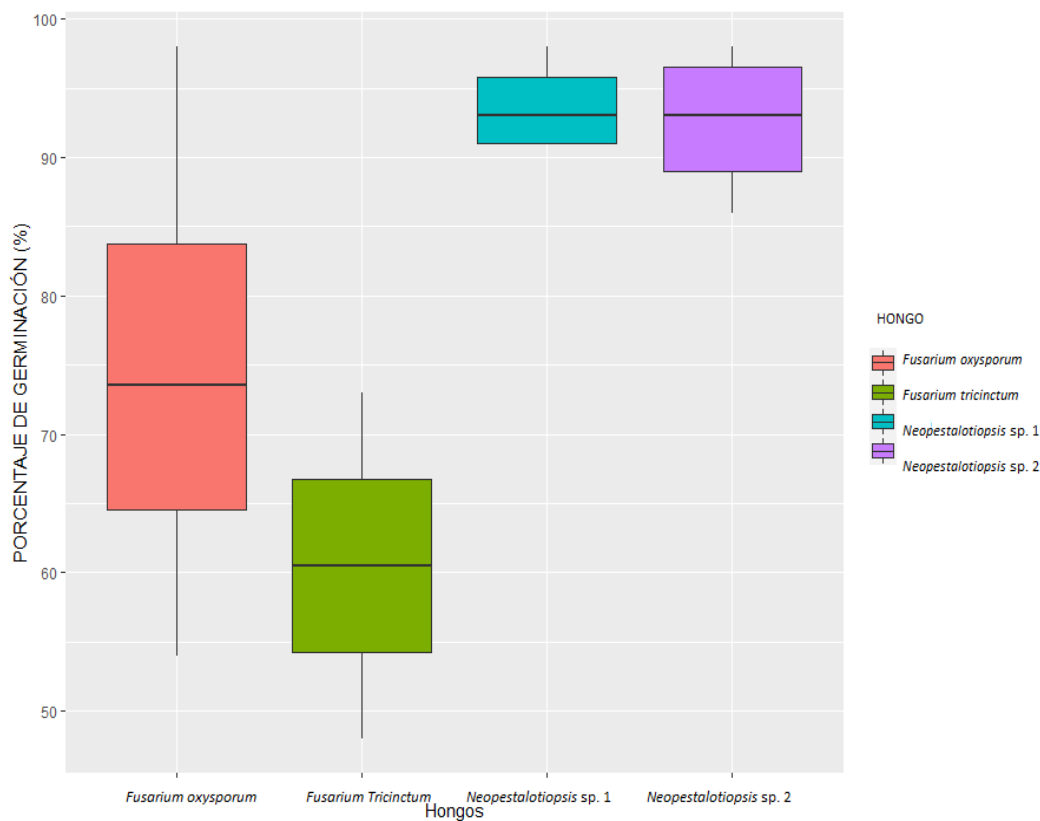


Gráfico 6-3: Germinación de las esporas de *Neopestalotiopsis* sp., y *Fusarium* sp.

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

Tabla 21-3: Análisis de varianza para la germinación de esporas.

Cuadro del análisis de varianza					
	GL	SQ	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	3	0,39342	0,13114	4,4994	0,030324
Error	10	0,29146	0,02914		
Total	13	0,68489			

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

Tabla 22-3: Test de Tukey para la germinación de esporas.

Test de Tukey	
Hongos	Germinación (%)
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	93,75 a ¹
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	92,50 a
<i>Fusarium oxysporum</i>	74,75 ab
<i>Fusarium tricinctum</i>	60,50 b

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según el Test

de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

Para la variable de la germinación de esporas existió un efecto significativo de los hongos en estudio ($P < 0,05$) (Tabla 10-3).

Para la germinación de esporas los mayores porcentajes de germinación fueron para las cepas de *Neopestalotiopsis* sp., cepa 1 y cepa 2 con un valor de germinación de los conidios de $93,75 \pm 3,40\%$ y $92,5 \pm 5,50$ respectivamente (Tabla 11-3).

1.1.2.2 Esporulación de los aislados fúngicos de *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp.

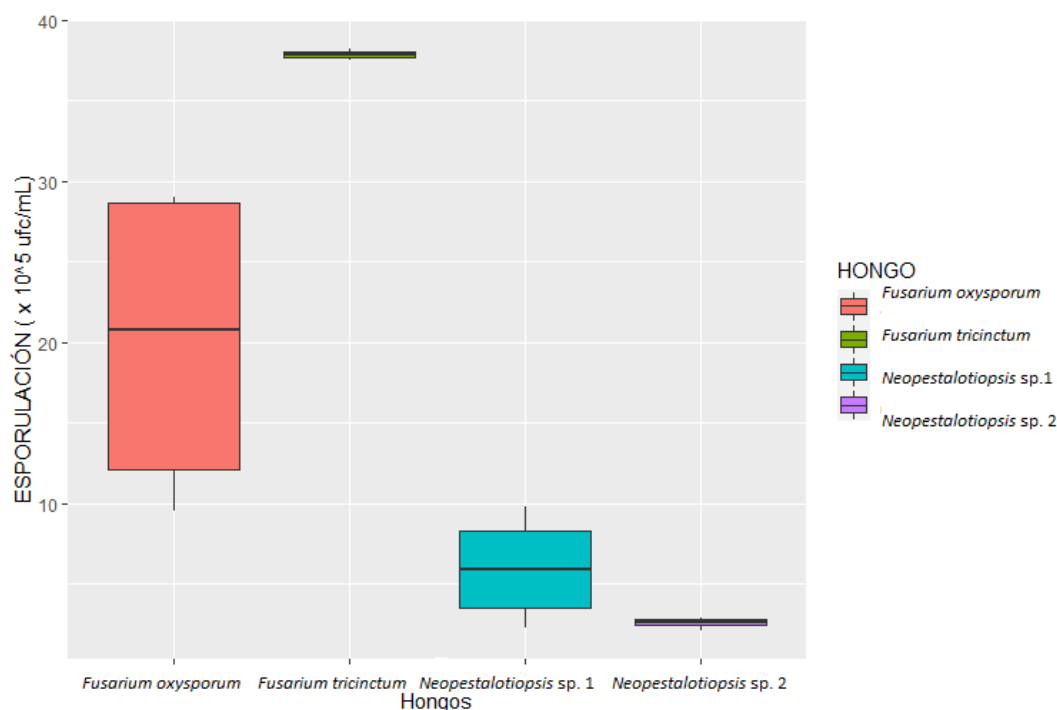


Gráfico 7-3: Esporulación de *Neopestalotiopsis* sp., y *Fusarium* sp en medio SNA

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

Tabla 23-3: Análisis de varianza de la variable esporulación.

Cuadro del análisis de varianza					
	GL	SQ	CM	Fc	Pr>Fc
Tratamiento	3	13,36	4,4525	19,014	0,00018
Error	10	2,34	0,2342		
Total	13	15,69			

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

Tabla 24-3: Test de Tukey para la variable esporulación.

Test de Tukey	
Hongos	Esporulación (propágulos/mL)
<i>Fusarium tricinctum</i>	37,85 x 10 ⁵ a ¹
<i>Fusarium oxysporum</i>	20,00 x 10 ⁵ a
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cepa 1	5,93 x 10 ⁵ b
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	2,59 x 10 ⁵ b

¹ Promedios con letras iguales son estadísticamente similares según

el Test de Tukey al 5%

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

Para la variable de la esporulación, existió un efecto de los hongos estudiados ($P < 0,05$) (Tabla 12-3).

Para la esporulación de los aislados fúngicos cultivados en medio SNA y evaluados a los 8 días, la mayor esporulación promedio fue de $37,85 \times 10^5$ y $20,00 \times 10^5$ propágulos/ mL para *F. tricinctum* y *F. oxysporum* respectivamente. Por otro lado, la cepa 2 y cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., presentaron las menores esporulaciones con valores promedio de $2,59 \times 10^5$ y de $5,93 \times 10^5$ propágulos/mL (Tabla 13-3).

1.1.3 Re-aislamiento

De las plantas de frutilla inoculadas con las diferentes cepas de *Neopestalotiopsis* sp., y diferentes métodos de inoculación que presentaron síntomas de marchitamiento y pudrición de la corona se aislaron hongos que presentaron características culturales y morfológicas (Fig. 6-3) similares a las de los hongos originalmente inoculados, concluyéndose que hongos del género *Neopestalotiopsis* sp., están principalmente asociados a la sintomatología de la enfermedad de la pudrición de la corona de la frutilla en Ecuador y particularmente en algunas localidades de la

provincia de Chimborazo. Adicionalmente con esta información se verifica el cuarto postulado de Koch.

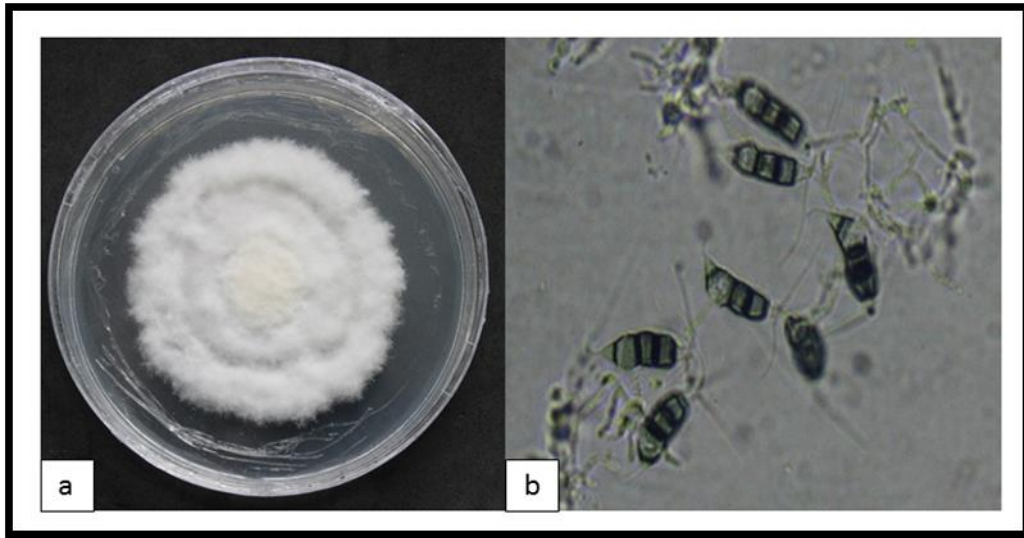


Figura 5-3: Caracteres culturales y morfológicos de *Neopestalotiopsis* sp., (a) colonia de *Neopestalotiopsis* sp, en medio PDA, (b) conidios pigmentados con 3 células y 3 apéndices.

Realizado por: Vallejo. A., 2021.

DISCUSIÓN

En la actualidad se conoce alrededor de 100 000 especies de hongos descritas en el mundo de las cuales apenas 8000 especies producen enfermedades en plantas (Agrios, pp. 273-275).

Neopestalotiopsis sp., es un hongo saprófito, pudiendo sobrevivir en tejidos muertos y también reportado como endófito (vive internamente en los tejidos sin causar síntomas) produciendo una amplia gama de metabolitos diversos químicamente novedosos y también ha sido reportado como patógeno (Maharachchikumbura et al. 2011). Algunas especies como *N. clavispora*, *N. mesopotámica*, *N. eucalypticola* y *N. rosae* causan enfermedades en varios cultivos como arándano, palma aceitera, guayaba, eucalipto etc. Durante los últimos años en algunos países se ha reportado a diferentes especies de *Neopestalotiopsis* causando enfermedades asociadas a la pudrición de corona de frutilla en países como España, México, Italia, Ecuador, Brasil y Argentina. En el presente estudio se utilizaron dos aislados de *Neopestalotiopsis* sp., que estuvieron asociados a síntomas de pudrición de la corona de la frutilla como necrosis de las hojas, ennegrecimiento del peciolo, marchitamiento de la planta muestras recolectadas en la zona de Yaruquíes en varios cultivos de frutilla, en dos periodos diferentes de tiempo. Posteriormente a la inoculación en las plantas de frutilla se reprodujeron los mismos síntomas observados en campo, de esta manera se demostró que es uno de los agentes patogénicos asociados a la pudrición de la corona en plantas de frutilla en la provincia de Chimborazo y particularmente en la zona en estudio. De los métodos de inoculación utilizados el más eficaz en la reproducción de los síntomas de pudrición de corona fue el método de punción en relación al método de suspensión lo que indica que de alguna manera el hongo *Neopestalotiopsis* sp., para poder infectar a la planta necesita de métodos indirectos de ingreso como heridas o aberturas naturales (Campaña.,2019). Lo cual ya fue confirmado para otros patógenos de la misma familia de *Neopestalotiopsis* como *Pestalotiopsis* (Rodríguez, et al., 2014).

Fusarium sp., es un hongo parásito facultativo, también saprófito con la capacidad de sobrevivir en materia orgánica y restos vegetales que potencialmente puede causar enfermedades en las plantas (Kenneth, 2017, pp. 117), algunas especies de *Fusarium* son endófitas pudiendo vivir internamente (en células y tejidos vasculares) sin causar ningún tipo de síntoma (Salazar et al., 2019, pp. 25 & Vasquez et al., 2017, pp. 365). En el caso de la especie de *F. oxysporum* se ha encontrado a este hongo asociado a la pudrición de corona en plantas de frutilla en países como: México, España, mostrando síntomas como: necrosis de las hojas y flores, un marchitamiento vascular. En el presente estudio se utilizaron dos especies de *Fusarium* (*F. oxysporum* y *F. tricinctum*) aisladas de plantas sintomáticas con pudrición de corona; sin embargo, al ser inoculadas por los métodos de punción y suspensión no presentaron síntomas, lo cual podría indicar que son endófitos, saprófitos y no patogénicos. Los dos aislados de *Fusarium* causaron

bajos niveles de necrosis a nivel de los tejidos de la corona, lo cual pudo haber estar asociado a una muerte celular programada de los tejidos debido a una respuesta de tipo hipersensible (respuesta de resistencia de tipo local) de los tejidos de la corona hacia aislados no patogénicos o saprófitos de *Fusarium*. Este tipo de respuesta de resistencia local y/o sistémica en donde se da una muerte celular programada, ha sido reportada como mecanismo de defensa la cual incluye producción de fitoalexinas, acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis y producción de especies reactivas de oxígeno, este mecanismo permite a la planta reaccionar ante microorganismos tanto patogénicos como saprófitos (Kenneth, 2002, pp. 27-28)

De los parámetros evaluados (área bajo la curva, índice de infección, pudrición de la corona, germinación, esporulación y tasa de crecimiento micelial) utilizados para evaluar la agresividad de los hongos inoculados los parámetros más eficientes fueron área bajo la curva del progreso de la enfermedad, índice de infección y pudrición de la corona. Los cuales permitieron determinar que el aislado de *Neopestalotiopsis* más agresivo fue el aislado 2 obtenido de plantas sintomáticas de la zona de Yaruquíes, provincia de Chimborazo en el año 2020.

En relación, a la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp., que fue menos agresiva de acuerdo a los mismos parámetros, este comportamiento pudo haber estado relacionado a una posible pérdida de agresividad debido a la antigüedad del aislamiento, este comportamiento ya ha sido reportado antes en otros hongos (Alaníz, 2012., pp.1-3). Los parámetros de esporulación y tasa de crecimiento micelial no mostraron ser eficientes para determinar agresividad en este estudio, en el caso de la esporulación se observó que las especies de *Fusarium* sp., tuvieron la capacidad de esporular mucho más que los aislados de *Neopestalotiopsis* sp. a pesar de estos no ser patogénicos.

El parámetro germinación de las esporas fue una variable asociada a la agresividad, los dos aislados de *Neopestalotiosis* sp., presentaron mayor porcentaje de germinación en relación a los aislados de *Fusarium* sp. lo que indicaría una mayor capacidad germinativa *in vivo* lo que ya fue demostrado en otros hongos (Nicolli et al., 2018).

La tasa de crecimiento micelial de los aislados patogénicos de *Neopestalotiopsis* sp., fue mucho menor en medio PDA a un temperatura de 30°C en relación a la temperatura de 25°C, lo cual indica que este hongo se desarrolla mucho mejor en temperaturas de 25°C (Barreiro, 201, pp. 10) indicando de esta manera que *Neopestalotiopsis* podría presentar una mayor adaptabilidad en zonas templadas, como las zonas de producción de frutilla en nuestra provincia, sin embargo esto debe ser comprobado con investigaciones adicionales de adaptabilidad a diferentes climas.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la asociación frecuente de *Neopestalotiopsis* sp., con la sintomatología de pudrición de corona en el cultivo de a frutilla en

las principales localidades muestreadas, y esto representan una alerta a una posible explosión epidémica de esta enfermedad en otras localidades de nuestro país en donde el cultivo de frutilla es una alternativa a otros productos, es importante comenzar a tomar medidas al respecto principalmente porque en otros países productores de frutilla como México, esta explosión epidémica ya ha sucedido (Rebollar et al. 2020).

CONCLUSIONES

- Las plantas de frutilla inoculadas con las dos cepas de *Neopestalotiopsis* sp., por el método de punción presentaron síntomas externos asociados a manchas necróticas en el envés de las hojas, coloración marrón a café oscuro y marchitamiento de las plantas. Las mismas plantas presentaron altos niveles de pudrición de los tejidos de la corona.
- Los dos aislados de *Neopestalotiopsis* sp., inoculados en las plantas de frutilla fueron patogénicos causando sintomatología externa (manchas necróticas, secamiento foliar y marchitamiento) y sintomatología interna (pudrición y necrosamiento de los tejidos de la corona).
- Ninguna de las especies de *Fusarium* sp., fueron patogénicas, esto se comprobó al no existir síntomas a nivel aéreo, como secamiento de follaje y marchitamiento de las plantas.
- La cepa 2 de *Neopestalotiopsis* sp. aislada en Yaruquies en la fecha 18/11/2020 mostró ser más agresiva según el índice de infección, área bajo la curva del progreso de la enfermedad y la pudrición de la corona en relación a la cepa 1 de *Neopestalotiopsis* sp.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para la evaluación de medidas de manejo cultural, biológico, químico, para *Neopestalotiopsis* sp. principal agente patogénico asociado a la pudrición de la corona de la frutilla en Chimborazo.
- Realizar estudios en otras zonas productoras de frutilla a nivel nacional para determinar la agresividad y patogenicidad de patógenos asociados a la pudrición de la corona.
- Se recomienda realizar estudios para la evaluación de antagonistas para el control biológico y químico

GLOSARIO

Acérvulo: Cuerpo frutificante sobresaliente parecido a un almohadón que contiene los conidióforos, conidios y algunas veces setas (PLATICAR, 2013).

Agresividad: La capacidad relativa de tipo cuantitativa de un patógeno de plantas (fitopatógeno) para colonizar y causar daños a las plantas (PLATICAR, 2013).

Aislado: Cepa de un organismo que es mantenido en cultivo puro, ya sea activo o preservado, bajo condiciones de laboratorio (Ulloa & Hanlin, 2006, p.14).

Aislamiento: Proceso que sigue para la obtención de un hongo u otro organismo en cultivo puro (Ulloa y Hanlin, 2006: p.14).

Conidio: Espora asexual nucleada, inmóvil, que generalmente se forma en el ápice o a un lado de una célula esporógena (conidiógena) especializada (Ulloa & Hanlin, 2006, p.120).

Espora: pequeña unidad de propagación unicelular o multicelular, asexual o sexual, móvil o inmóvil, que es capaz de originar un nuevo individuo (Ulloa & Hanlin, 2006, p.206).

Esporulación: Acción y efecto de esporular (Ulloa & Hanlin, 2006, p.209).

Germinación: conjunto de fenómenos relativos al organismo que germina, ya sea se formen uno o varios tubos germinales a partir de una sola espora, ya sea sexual o asexual (Ulloa & Hanlin, 2006, p.265).

Inoculación: Acto o proceso de inocular; especialmente la introducción de un patógeno en un organismo vivo (Ulloa & Hanlin, 2006, p.314).

Infectar: proceso por el cual un organismo entra, invade y establece una relación de patogenicidad con un organismo hospedante (Ulloa & Hanlin, 2006, p.312).

Inóculo: Material fúngico que es transferido (micelio, esporas) que es transferido a un organismo, un sustrato o un medio de cultivo con el fin de propagarlo (Ulloa & Hanlin, 2006, p.314).

Macroconidio: Conidio o espora de reproducción asexual, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por su multicelular (Ulloa & Hanlin, 2006, p.352).

Medio: sistema o sustrato nutritivo que se utiliza para el cultivo artificial de hongos y otros microorganismos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.357).

Micelio: conjunto o masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo o talo de un hongo (Ulloa & Hanlin, 2006, p.364).

Microconidio: Conidio pequeño, generalmente unicelular (Ulloa & Hanlin, 2006, p.376).

Necrosis: Muerte parcial o total de células o tejidos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.396).

BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. *Plant Pathology*. 1ªed. United States of America: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 0-12-044565-4.

ARA, T; et al. “The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing Crown rot disease on strawberry(*Fragaria ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity”. *International Journal of Biosciences* [en línea], 2017, (Bangladesh) 11(4), pp. 350-358. [Consulta: 12 diciembre 2020]. ISSN 22206655. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321306582_The_first_report_of_Pestalotiopsis_sp_causing_crown_rot_disease_on_strawberry_Fragaria_X_ananassa_Duch_in_Bangladesh_and_evaluation_of_fungicide_activity

BADENIER, M. “Cultivo de frutilla, en una realidad sin Bromuro de Metileno en Chile” [en línea].2015, (Chile). [Consulta: 13 enero 2021]. Disponible en: https://www.unido.org/sites/default/files/2016-11/straw_0.pdf

BAINO, O; et al. “First Report of *Macrophomina phaseolina* Causing Strawberry Crown and Root Rot in Northwestern Argentina”. *APS Plant disease Journals* [en línea], 2011,(Argentina) 95 (11), pp. 1477-1477. [Consulta: 12 diciembre 2020]. ISSN 0191-2917. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/264045263_First_Report_of_Macrophomina_phaseolina_Causing_Strawberry_Crown_and_Root_Rot_in_Northwestern_Argentina

BÁRCENAS,D; et al. “Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México”. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology* [en línea], 2019, (México) 37 (3), pp. 454-463. [Consulta: 12 diciembre 2020]. ISSN 2007-8080. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v37n3/2007-8080-rmfi-37-03-454.pdf>

BONET GIGANTE, Julio. Desarrollo y caracterización de herramientas Genómicas en *Fragaria* diploide para la mejora del cultivo de fresa [en línea] (Trabajo de titulación). (Tesis Doctoral) Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Bellaterra, Barcelona. 2010. pp. 3. [Consulta: 14 enero 2021]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/42009#page=15>

CÁMARA DE COMERCIO DE BOGOTÁ. *Manual de Fresa* [en línea], 2015, (Bogotá).pp. 1-54.[Consulta: 23 febrero 2021]. Disponible en: <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14312/Fresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CEJA, L; et al. “Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico”. *Agrociencia* [en línea], 2018, (México) 42 (4). [Consulta: 24

enero 2021]. ISSN 2521-9766. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000400008.

CHAMORRO, M; et al. “First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain”. *Plant Disease*. [en línea], 2016, (España) 100 (7), pp. 1495. [Consulta: 24 enero 2021]. ISSN 01912917. Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>

CONVERSE, W.D.G. & R.H. “*Diseases of Strawberry*”. [en línea], 1993,(Estados Unidos). [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en:
<https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Strawberry.aspx>

CUEVAS, M; et al. “*Manual de Cultivo de fresa*” [en línea], 2018, (Coalcomán, Michoacán) .pp. 2-4. [Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en:
<https://www.itscoalconman.edu.mx/content/descargas/vinculacion/MANUAL%20PARA%20CULTIVO%20DE%20FRESA%20EN%20COALCOMAN.pdf>

DUNGA, L; et al. “The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberries in dalat”. *Natural Sciences and Technology* . [en línea], 2016, (Dalat) 6 (3), pp. 364-376. [Consulta: 24 enero 2021]. ISSUE 3. Disponible en:
<http://14.238.96.163/index.php/tckhdhdl/article/view/81/34>

ESSA, T; et al. “Characterization and Chemical Control of *Neopestalotiopsis rosae* the Causal Agent of Strawberry Root and Crown Rot in Egypt”. *Egyptian Journal of Phytopathology*. [en línea], 2018,(Egipto) 46(1), pp. 1-19. [Consuta: 24 enero 2021]. Disponible en:
https://ejp.journals.ekb.eg/article_87411_018deeab8216b37f40dd765708fd8c60.pdf

GERIN, D; et al. “First Report of *Macrophomina phaseolina* Causing Crown and Root Rot on Strawberry in Italy”. *Plant Disease*. [en línea], 2018, (Italia) 102(9), pp. 1857. [Consulta: 24 enero 2021]. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-18-0191-PDN>

GUEVARA, J; et al. “First Report of Strawberry Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* in Ecuador”. *Plant Disease*. [en línea], 2020, (Ecuador). [Consulta: 24 enero 2021]. Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-07-19-1444-PDN>

HEITEFUSS, R. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species* [en línea]. United States of America. ISBN 0849311187, pp. 273.

HETMAN, B. “Fungi colonizing roots of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.)”. *AGRIS since*. [en línea], 2001, (Polonia) 9, pp. 85-97. [Consulta: 24 enero 2021]. Disponible en:

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PL2004000821>

HUSAINI, A & NERI, D. *Strawberry Growth, Development and Diseases* [en línea]. ISBN 9781780646633, pp. 157-161.

INTRIAGO et. al. “Outbreaks of crown rot in *Fragaria x ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador”. *Emirates Journal of Food and Agriculture* [en línea], 2021, (Ecuador). pp. 7-9. [Consulta: 24 enero 2021].

LESLIE, F.J & SUMMERELL, A.B. “*The Fusarium Laboratory Manual*” [en línea], 2006, 1^a ed. United States of America: Blackwell Publishing, 2006.

LLUMIQUINGA QUISHPE, Pedro Alexis. Evaluación de fertilización mineral y órgano/mineral con fertirriego en el cultivo de frutilla *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchense; Variedad albión. [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero Agrónomo) Universidad Central de Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Ingeniería Agronómica, Quito, Ecuador. 2017. pp. 1-3. [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9674/1/T-UCE-0004-17.pdf>

MACHÍN, A; et al. “First Report of Root and Crown Rot Caused by *Neopestalotiopsis clavisporea* on Strawberry in Uruguay”. *Plant Disease*, [en línea], 2019, (Uruguay) 103(11), pp. 2946-2946 .[Consulta: 24 enero 2021]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN>

MAHARACHCHIKUMBURA, S; et al. “*Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity”. *Fungal Diversity*. [en línea], 2011, 50 (1), pp. 167-187. [Consulta: 14 abril 2021]. ISSN 15602745. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-011-0125-x>.

MARISCAL, A; et al. “Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Guanajuato, México” *Agrociencia*. [en línea], 2017, 51(6). [Consulta: 24 enero 2021]. ISSN 14053195. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952017000600673&script=sci_abstract

MORALES, C; et al. “*Manual de manejo agronómico de la frutilla Inia*”. [en línea]. 2017, (Santiago, Chile). pp. 102. [Consulta en 18 mayo 2021]. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6713/NR40987.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MORALES, L; et al. “First Report of Leaf Spot and Anthracnosis Caused by *Pestalotiopsis* sp. on Strawberry in Puebla, México”. *Plant Disease*, [en línea], 2019, (México) 103 (10), pp.

2668. [Consulta: 24 enero 2021]. Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-05-19-1010-PDN>

OBREGÓN, V; et al. “First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina”. *Plant Disease*, [en línea], 2018, (Argentina) 102.pp. 1-2. [Consulta: 24 enero 2021]. ISSN 0191-2917. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/326566639_First_Report_of_Neopestalotiopsis_clavispora_Causing_Root_and_Crown_Rot_on_Strawberry_Plants_in_Argentina

OTUNA REA, Luis Omar. Análisis del rendimiento de la fresa (*Fragaria chiloensis* L. Duch) sometida a diferentes tipos de sustratos dentro de un cultivo semihidropónico en la parroquia Salinas provincia del Imbabura [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero Agrónomo) Univerisdad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Ingeniería Agronómica, El Ángle, Carchi, Ecuador. 2012. pp. 6-7. [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en:
<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/975/T-UTB-FACIAG-AGR-000181.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PALCHISACA DONCON, María José. Evaluación de soluciones nutritivas con cinco dosis de calcio en el cultivo de fresa (*Fragaria ananassa*) cultivar albión mediante fertirriego en la parroquia san luis cantón riobamba [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniera Agrónoma) , Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica, Riobamba, Ecuador. 2018. pp.1-3. [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8488/1/13T0860.pdf>

PASTRANA, A.M; et al. “*Fusarium oxysporum* f. sp.mori, a New Forma Specialis causing *Fusarium* Wilt of Blackberry”. *APS Publications* [en línea], 2017,(Mexico) 101 (2), pp.2066-2071.[Consulta: 15 enero 2021]. ISSN 0191-2917.Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-03-17-0428-RE>.

REBOLLAR, A; et al. “An Emerging Strawberry Fungal Disease Associated with Root Rot, Crown Rot and Leaf Spot Caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico”. *Plant Disease*, [en línea], 2020, (México) .[Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en:
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>

ROBLES, A; et al. “Estudio de la patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp., asociados a la marchitez vascular del Babaco en Loja-Ecuador”. *Revista Centro de Biotecnología*, [en línea], 2014, (Ecuador) 3 (1) , pp. 63-74.[Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/279941150_Estudio_de_la_patogenicidad_de_aislados_de_Fusarium_spp_asociados_a_la_marchitez_vascular_del_Babaco_en_Loja-Ecuador

SHANER, G; & FINNEY, R "The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox". *The American Phytopathological Society*, [en línea],1977, 67, pp. 1051-1056.[Consulta: 15 enero 2021]. Disponible en: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n08_1051.PDF

Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools.Database (Oxford). 2020: baaa062

SIGILLO, L; et al. "First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy". *Journal of Plant Pathology*, [en línea], 2019, (Italia). [Consulta: 15 enero 2021]. ISSN 22397264. [Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-03-19-0673-PDN>]

TANAKA, M; et al. " Patogenicidade de *Rhizoctonia solani* em morangueiro". *Bragantia Campinas*, [en línea], 1995, (Río de Janeiro) 54 (2). pp. 319-324. [Consulta: 15 enero 2021]. ISSN 0006-8705. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/brag/a/6pQy9DP33sBYc9m7DkFSrLp/?format=pdf&lang=pt>

ULLOA, M; & HANLIN, R. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Minnesota-U.S.A.: The American Phytopathological Society, 2006. ISBN-13: 978-0-89054-3412, pp. 4-482.

VAN, H; et al. "Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*". *Acta Horticulturae*,[en línea], 2017, (Bélgica) 1156 (1). pp. 781-785. [Consulta: 15 enero 2019]. ISSN 05677572. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316711985_Crown_rot_in_strawberry_caused_by_Pestalotiopsis

VOLCY, C; "Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología" *Agronomía Colombiana*, [en línea], 2008, (Colombia- Medellín) 26(1). [Consulta: 18 mayo 2021]. ISSN 0120-9965. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Zazzetta,M., et al. "Enfermedades en el cultivo de frutilla en el valle bonaerense del río Colorado".2018. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/enfermedades_frutilla_-_febrero_2018.pdf

ANEXOS

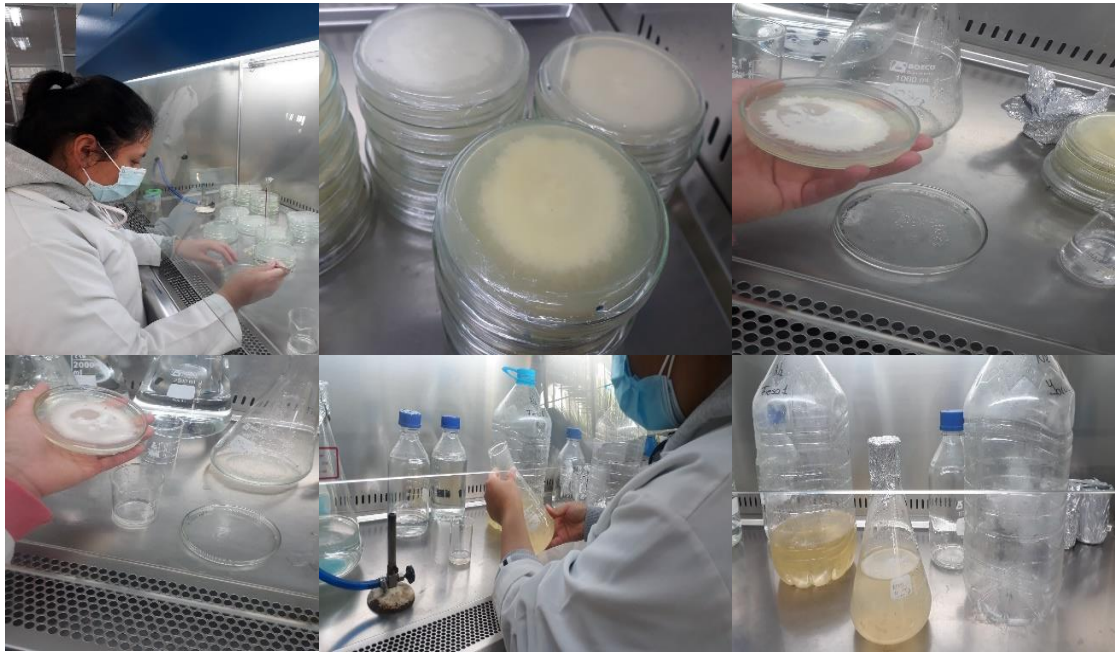
ANEXO A: MANEJO CULTURAL DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA EN INVERNADERO.



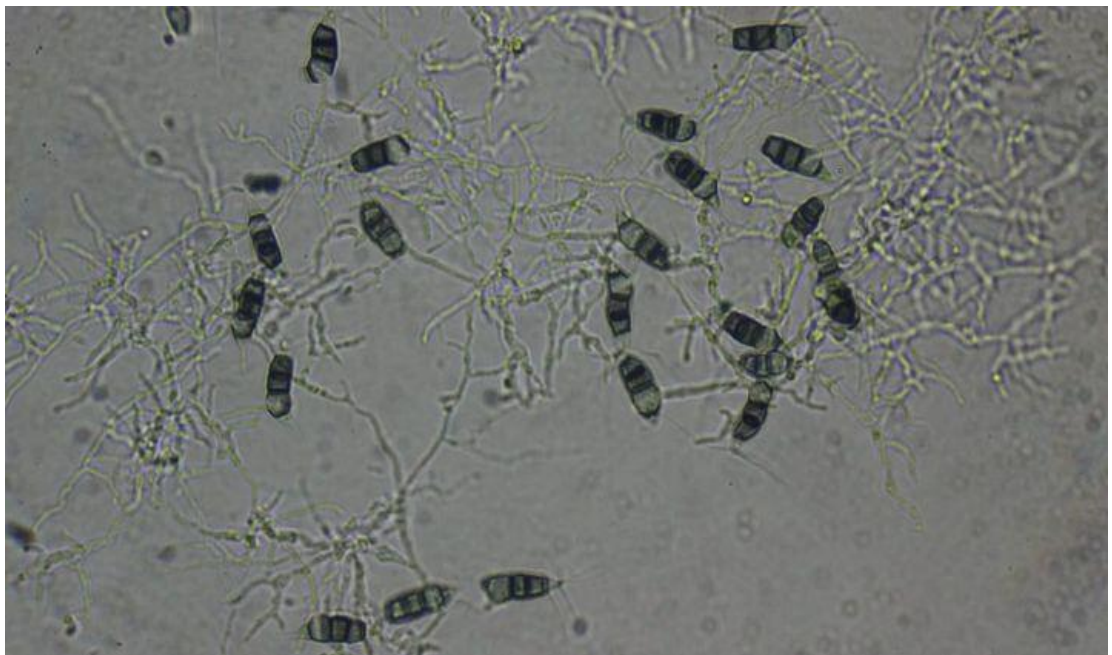
ANEXO B: INOCULACIÓN DE *Neopestalotiopsis* sp. y *Fusarium* sp. POR EL MÉTODO DE SUSPENSIÓN Y PUNCIÓN



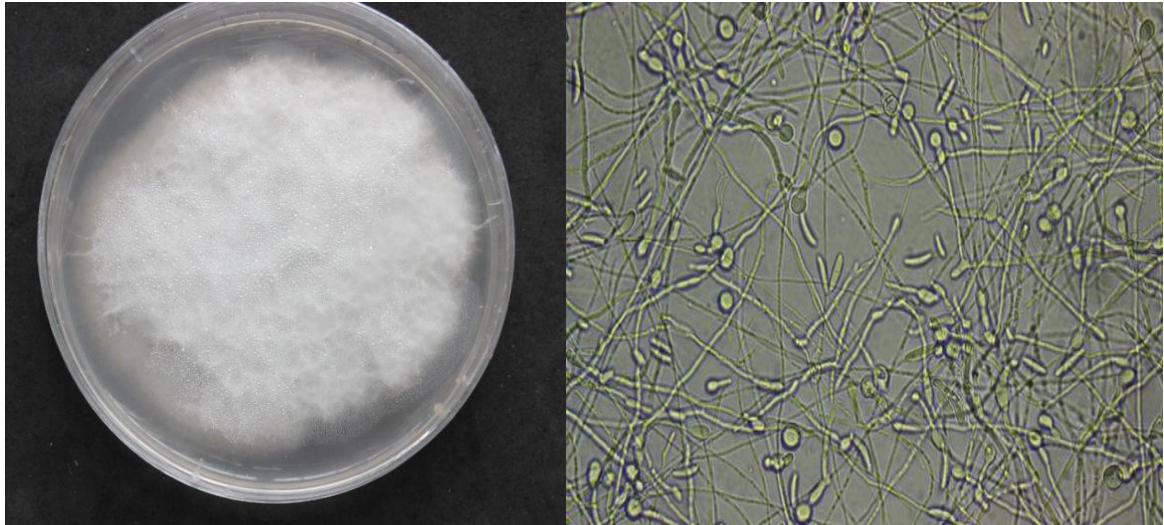
ANEXO C: PREPARACIÓN DE INOCULO DE *Neopestalotiopsis* sp., Y *Fusarium* sp.



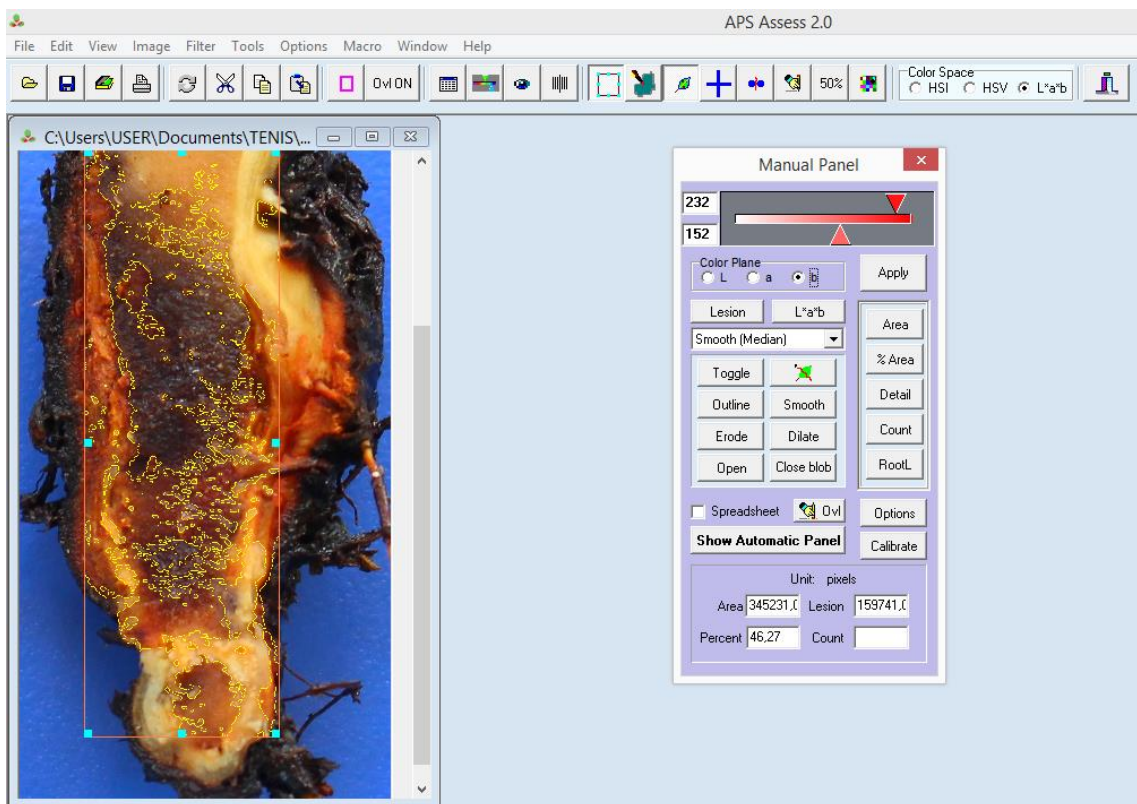
ANEXO D: EXPERIMENTO DE LA GERMINACIÓN DE *Neopestalotiopsis* sp.



ANEXO E: EXPERIMENTO DE LA ESPORULACIÓN Y GERMINACIÓN DE *Fusarium* sp.



ANEXO F: EVALUACIÓN DE NIVEL DE NECROSIS DE LA CORONA USANDO MEDIANTE EL USO DEL PROGRAMA SOFTWARE ASSESS 2.0.



ANEXO G: INFORMACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

Cultivo	Hongo	Variedad	Localidad	Año
Frutilla	<i>Neopestalotiopsis</i> cepa 1	Albión	Yaruquies	2020
	<i>Neopestalotiopsis</i> cepa 2	Albión	Yaruquies	2020
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Albión	Yaruquies	2020
	<i>Fusarium tricinctum</i>	Albión	ESPOCH	2020

ANEXO H: EVALUACIÓN DEL INDICE DE INFECCIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS

Método de inoculación	Hongo	Tiempo (días)	Porcentaje del índice de infección (%)
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	27	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	2	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	3	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	6	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	12	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	15	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	18	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	21	0
Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	24	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	1	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	2	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	6	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	9	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	12	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	15	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	18	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	21	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	24	0
Punción	<i>Fusarium tricinctum</i>	27	0
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	1	0
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	2	0
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	3	18,75±12,5 ^a
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	6	30±21,602
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	9	50±4,082
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	12	60±10,801
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	15	51,25±2,5
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	18	51,25±2,5
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	21	63,75±13,149
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	24	63,75±13,149
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	27	70±10
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	1	0

Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	2	0
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	3	10±12,247
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	6	16,25±10,307
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	9	22,5±2,886
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	12	27,5±8,66
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	15	37,5±9,574
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	18	45±13,540
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	21	58,75±13,149
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	24	77,5±5
Punción	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	27	77,5±5
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	2	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	3	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	6	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	9	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	12	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	15	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	18	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	21	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	24	0
Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	27	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	1	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	2	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	3	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	6	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	9	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	12	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	15	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	18	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	21	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	24	0
Suspensión	<i>Fusarium tricinctum</i>	27	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	1	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	2	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	3	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	6	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	9	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	12	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	15	1,25±2,5
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	18	1,25±2,5
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	21	1,25±2,5
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	24	1,25±2,5
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	27	1,25±2,5
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	1	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	2	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	3	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	6	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	9	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	12	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	15	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	18	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	21	0
Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	24	0

Suspensión	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	27	0
------------	-------------------------------------	----	---

^a Promedio \pm la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021.

ANEXO I: EVALUACIÓN DEL ÁREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD

Hongo	Método de inoculación	Porcentaje de infección (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Punción	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Suspensión	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Punción	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Suspensión	0
<i>Fusarium tricinctum</i>	Punción	0
<i>Fusarium tricinctum</i>	Suspensión	0
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	Punción	637,5 \pm 244,846 ^a
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 1	Suspensión	16,875 \pm 33,75
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	Punción	1101,25 \pm 99,278
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. cepa 2	Suspensión	0

^a Promedio \pm la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021.

ANEXO J: EVALUACIÓN PROMEDIO DE LA SEVERIDAD DE PUDRICIÓN DE CORONA.

Hongo	Método de inoculación	Porcentaje de pudrición (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Inyección	24,45 \pm 21,21 ^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	Suspensión	24,74 \pm 19,72
<i>Fusarium tricinctum</i>	Inyección	24,12 \pm 27,00
<i>Fusarium tricinctum</i>	Suspensión	38,11 \pm 31,88
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	Inyección	55,03 \pm 22,74
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	Suspensión	17,26 \pm 19,47
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	Inyección	62,76 \pm 19,07
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	Suspensión	20,90 \pm 21,13

^a Promedio \pm la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021.

ANEXO K: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE LOS AISLADOS FÚNGICOS EN MEDIO SNA Y PDA A UNA TEMPERATURA DE 25°C.

Hongo	Medio de cultivo	Temperatura °C	Tiempo (h)	Promedio del crecimiento micelial (diámetro/mm)
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	48	15,1±19,69 ^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	96	50,22±2,34
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	120	59,35±1,90
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	144	65,68±1,37
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	264	74,82±1,50
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	25	48	5,57±2,08
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	25	96	41,61±6,68
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	25	120	54,29±15,43
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	25	144	75,69±3,42
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	25	264	78,18±1,39
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	25	48	5,82±0,79
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	25	96	43,40±8,95
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	25	120	52,94±8,48
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	25	144	65,14±2,35
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	25	264	73,43±1,33
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	25	48	-3,72±2,56
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	25	96	6,90±23,80
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	25	120	11,18±32,36
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	25	144	13,69±37,37
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	25	264	15,59±41,17
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	25	48	11,85±2,59
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	25	96	49,29±1,39
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	25	120	56,62±1,75
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	25	144	63,52±2,50
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	25	264	70,02±0,94
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	25	48	16,22±2,66
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	25	96	55,18±3,42
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	25	120	65,30±2,28
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	25	144	70,84±1,99
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	25	264	75,03±1,23
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	25	48	10,61±2,71
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	25	96	54,33±4,53
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	25	120	62,26±4,91
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	25	144	67,68±4,25
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	25	264	71,57±0,99
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	25	48	9,97±3,78
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	25	96	52,79±2,17
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	25	120	61,47±2,05
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	25	144	67,38±1,40

<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	25	264	72,79±0,53
--------------------------------	-----	----	-----	------------

^aPromedio ± la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021

ANEXO L: EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE LOS AISLADOS FÚNGICOS EN MEDIO SNA Y PDA A UNA TEMPERATURA DE 30°C.

Hongo	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Promedio del crecimiento micelial (diámetro/mm)
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	30	48	-5,00±0 ^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	30	96	42,13±3,15
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	30	120	50,90±2,77
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	30	144	59,89±3,53
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	30	264	67,87±2,76
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	30	48	-1,05±4,58
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	30	96	32,54±9,21
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	30	120	42,81±11,65
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	30	144	55,78±13,33
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	30	264	67,95±14,48
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	30	48	3,94±0,53
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	30	96	44,65±2,70
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	30	120	53,21±2,59
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	30	144	60,21±3,66
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	30	264	68,52±2,57
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	30	48	-5,00±0
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	30	96	6,95±23,90
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	30	120	10,94±31,87
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	30	144	13,28±36,56
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	30	264	14,86±39,72
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	30	48	-5,00±0
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	30	96	24,12±5,93
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	30	120	31,57±5,90
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	30	144	37,91±5,05
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	30	264	61,44±3,76
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	30	48	-5,00±0
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	30	96	6,88±2,09
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	30	120	10,64±3,83
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	30	144	14,13±5,71
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	30	264	29,71±10,04
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	30	48	-5,00±0
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	30	96	11,31±3,52
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	30	120	17,29±4,92
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	30	144	20,52±8,65
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	PDA	30	264	34,50±18,20

<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	30	48	-3,07±3,86
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	30	96	22,50±7,96
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	30	120	28,71±8,61
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	30	144	35,28±9,67
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	SNA	30	264	57,51±7,75

^a Promedio ± la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021

ANEXO M: EVALUACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO MICELIAL (mm/día) DE LOS AISLADOS FÚNGICOS EN MEDIO SNA Y PDA A UNA TEMPERATURA DE 25°C Y 30°C.

Hongo	Medio de cultivo	Temperatura (°C)	Promedio del crecimiento micelial (diámetro mm/día)
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	6,80±0,14 ^a
<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	30	6,17±0,25
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	25	7,11±0,13
<i>Fusarium oxysporum</i>	SNA	30	6,18±1,32
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	25	6,68±0,12
<i>Fusarium tricinctum</i>	PDA	30	6,23±0,23
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	25	1,42±3,74
<i>Fusarium tricinctum</i>	SNA	30	1,35±3,61
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	30	5,59±0,34
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	25	6,37±0,09
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	PDA	30	2,70±0,91
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	SNA	25	6,82±0,11
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2	PDA	25	6,51±0,09
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2	PDA	30	3,14±1,65
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2	SNA	25	6,62±0,05
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.2	SNA	30	5,23±0,70

^a Promedio ± la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021

ANEXO N: EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS ESPORAS DE LOS AISLADOS FÚNGICOS.

Hongo	Porcentaje promedio de germinación (%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	74,75±18,57 ^a
<i>Fusarium tricinctum</i>	60,5±17,67
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 1	93,75±3,40
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. 2	92,5±5,50

^a Promedio ± la desviación estándar

Realizado por: Vallejo, A., 2021.

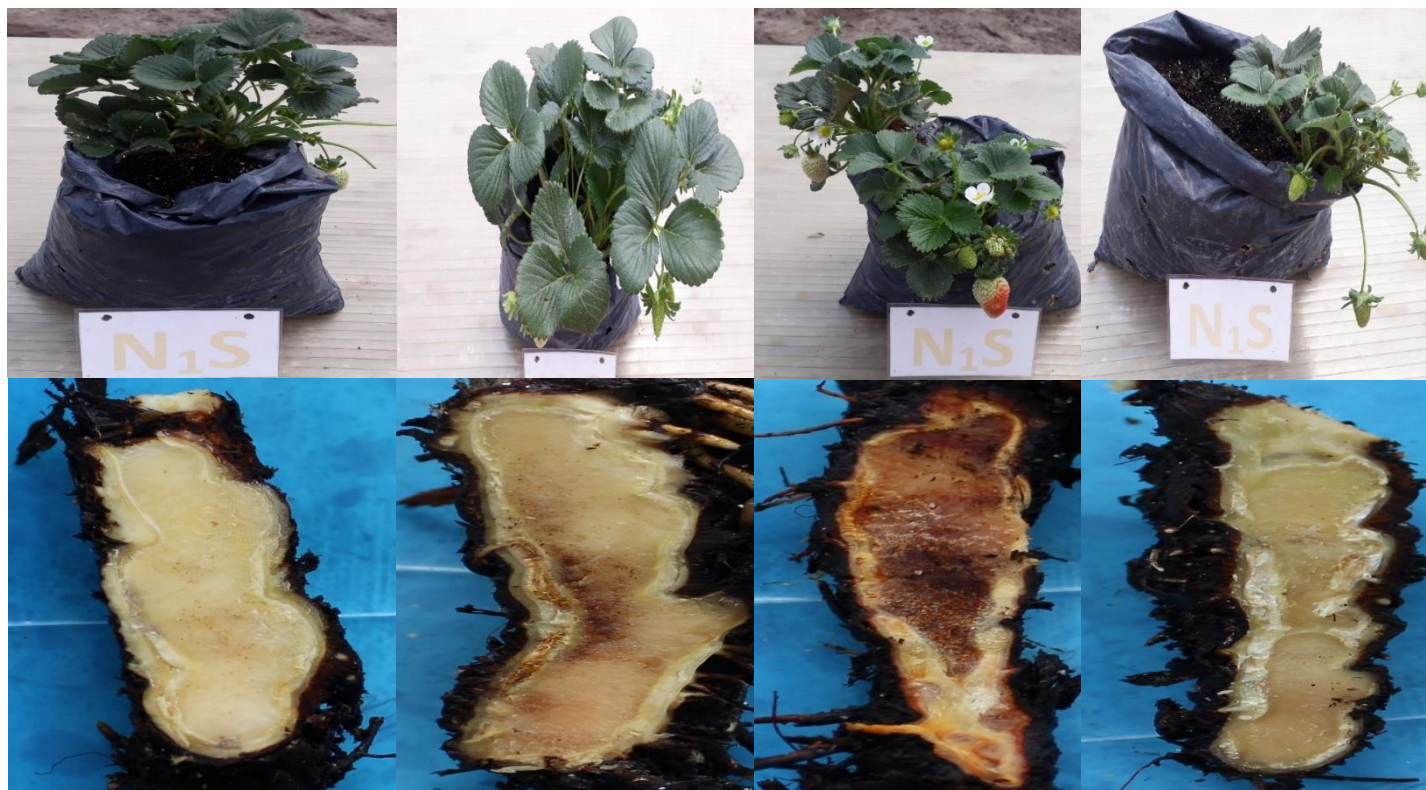
ANEXO O: EVALUACIÓN DE LA ESPORULACIÓN DE LOS AISLADOS FÚNGICOS.

Hongo	Esporulación promedio(ufc/mL)
<i>Fusarium oxysporum</i>	20,00 x 10 ⁵ ±10,19 ^a
<i>Fusarium tricinctum</i>	37,85 x 10 ⁵ ±0,49
<i>Neopestalotiopsis</i> sp, cepa 1	5,93 x 10 ⁵ ±3,44
<i>Neopestalotiopsis</i> sp., cepa2	2,59 x 10 ⁵ ±0,34

^a Promedio ± la desviación estándar

Realizado por: Vallejo. A., 2021

ANEXO P: CORTE LONGITUDINAL DE LA CORONA DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA INOCULADAS CON *Neopestalotiopsis* sp. CEPA 1
(MÉTODO DE INOCULACION POR SUSPENSIÓN)

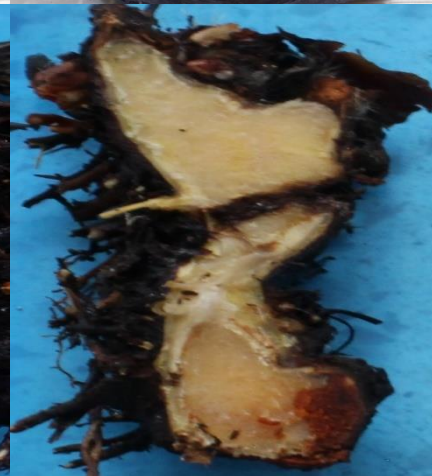
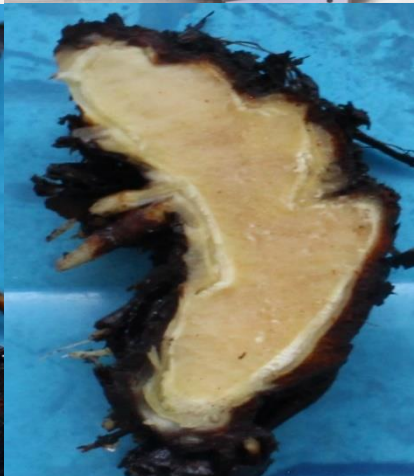


**ANEXO Q: CORTE LONGITUDINAL DE LA CORONA DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA INOCULADAS CON *Neopestalotiopsis* sp. cepa 1
(MÉTODO DE INOCULACION POR PUNCIÓN)**



ANEXO R: CORTE LONGITUDINAL DE LA CORONA DE LAS PLANTAS DE FRUTILLA INOCULADAS CON *Fusarium oxysporum* (MÉTODO DE INOCULACIÓN POR PUNCIÓN Y SUSPENSIÓN)

**Método de
punción**



**Método de
suspensión**



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 30 / 08 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Anghela Vanessa Vallejo Garcés</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Recursos Naturales</i>
Carrera: <i>Agronomía</i>
Título a optar: <i>Ingeniera Agrónoma</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.</i>

**LUIS
ALBERTO
CAMINOS
VARGAS**

Firmado digitalmente por LUIS
ALBERTO CAMINOS VARGAS
Nombre de reconocimiento
(DN): c=EC, I=RIOBAMBA,
serialNumber=0602766974,
cn=LUIS ALBERTO CAMINOS
VARGAS
Fecha: 2021.08.30 16:06:55
-05'00'



1500-DBRA-UTP-2021