

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Evaluación morfológica y de patogenicidad del hongo
Neopestalotiopsis como agente causal de la pudrición de corona
en frutillas (*Fragaria x ananassa*) variedad Albión.

Joussy Anahí Hidrobo Chávez

Ingeniería en Agroempresas

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Agroempresas

Quito, 28 de agosto de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
Colegio Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Evaluación morfológica y de patogenicidad del hongo
Neopestalotiopsis como agente causal de la pudrición de corona
en frutillas (*Fragaria x ananassa*) variedad Albión.

Joussy Anahí Hidrobo Chávez

Nombre del profesor, Título académico: Antonio León, PhD.

Firma del profesor:

Quito, 28 de agosto de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Joussey Anahí Hidrobo Chávez

Código: 00131917

Cédula de Identidad: 1723267637

Lugar y fecha: Quito, 20 de agosto de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La frutilla (*Fragaria x ananassa*) es una planta distribuida y producida por el mundo la cual es cotizada por su aroma y sabor. Desde el 2016, la producción de frutillas en el Ecuador se ha reducido en especial por la enfermedad llamada “pudrición de la corona”. Esta enfermedad presenta como sintomatología coloración rojiza intervenal en las hojas nuevas, coloración marrón a café en las hojas viejas, peciolo necrosado, escaso desarrollo vegetativo, marchitez y mortandad. En este estudio se identificó y probó bajo pruebas de patogenicidad el agente causal de la pudrición de la corona en las frutillas. Se demostró que el patógeno se hospeda en el suelo de áreas de producción causando alta mortalidad y bajos niveles de rendimiento. La adición de cascarilla al suelo y esterilización del mismo redujo significativamente la mortalidad e incrementó el número de hojas nuevas, área foliar y diámetro de la corona. El mejor medio de cultivo para aislar el patógeno de plantas sintomáticas fue Avena Agar donde se obtuvo un 100% de crecimiento. La morfología y morfometría del hongo patógeno demostró que se trata del género *Neopestalotiopsis*. Las plantas del bioensayo de patogenicidad presentaron sintomatología idéntica a las plantas enfermas de campo a los 6 días después de haber sido inoculadas. Se demuestra con base en la sintomatología, morfología macro y microscópica la identificación del patógeno como *Neopestalotiopsis*. Además, se visualizó el nivel patogenicidad más frecuente con decoloración de la corona de frutilla desde 25% a 75% al finalizar los 41 días del bioensayo. Finalmente, con la correcta identificación del agente causal al visualizar los primeros síntomas de la enfermedad se puede programar un control eficiente del problema en campo.

Palabras claves: *Fragaria x ananassa*, Morfometría, *Neopestalotiopsis*, Patogenicidad Pudrición de corona, Sintomatología.

ABSTRACT

Strawberry is a worldwide dispersed and produced plant, which is valued for its flavor and fragrance. Since 2016, in Ecuador strawberry production has been decreased in special for crown rot disease. Symptoms of this disease are reddish interveinal coloration in new leaves, rust brown coloration in old leaves, necrotic petioles, scarce vegetative development, wilting and mortality. This study identified and approved under pathogenicity tests the causal agent of the crown rot in the strawberries. The pathogen was shown to be housed in soil from production areas causing high mortality and low yield levels. The addition of rice husk to the soil and sterilize it help to decrease in a significant way the mortality and increase the number of new leaves, foliar area and crown diameter. The best culture medium to isolate the pathogen from symptomatic plants was Oats Agar because it obtained a 100% of growth. The morphology and morphology of the pathogenic fungus showed that it is the genus *Neopestalotiopsis*. The pathogenicity test plants showed the same symptoms at the 6 days after the first inoculation than the infected plants looked in the strawberry field. It is demonstrated based on symptomatology, macro and microscopic morphology the identification of the pathogen as *Neopestalotiopsis*. In addition, the most common pathogenicity level with strawberry crown discoloration from 25% to 75% at the end of the 41 days of bioassay was displayed. Finally, With the correct identification of the causal agent when visualizing the first symptoms of the disease, efficient control can be scheduled in the field.

Keywords: *Fragaria x ananassa* , Morphometry, *Neopestalotiopsis*, Pathogenicity, Crown rot, Symptomatology.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	12
1.1	Antecedentes	12
1.2	Justificación	14
II.	MARCO TEÓRICO	15
2.1	Cultivo de Frutilla	15
2.1.1	Taxonomía y Fisiología	15
2.1.2	Manejo agronómico	17
2.2	Neopestalotiopsis	20
III.	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo General.....	21
3.2	Objetivos Específicos	22
3.3	Hipótesis	22
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1	Condiciones del experimento.....	22
4.2	Evaluación del sustrato	23
4.2.1.	Recolección y desinfección del suelo	23
4.2.2.	Diseño experimental e instalación del experimento	23
4.2.3.	Recolección de datos y Análisis estadístico.	24
4.3	Aislamiento de <i>Neopestalotiopsis</i>	25
4.3.1.	Síntomatología y recolección.....	25
4.3.2.	Desinfección de las muestras.....	25
4.3.3.	Preparación de medios de cultivo	26
4.3.4.	Siembra de material vegetal.....	26
4.3.5.	Recolección de datos y Análisis estadístico.	27
4.4	Caracterización morfológica.....	27
4.5	Prueba de patogenicidad	28
4.5.1.	Bioensayo de patogenicidad	28
4.5.2.	Recolección de datos y Análisis estadístico	29
V.	RESULTADOS	30
5.1	Evaluación del suelo	30
5.1.1.	Mortalidad.....	30
5.1.2.	Diámetro de la corona.....	31
5.1.3.	Área foliar	31
5.1.4.	Número de hojas	32

5.2	Aislamiento de <i>Neopestalotiopsis</i>	33
5.2.1.	Identificación de sintomatología.....	33
5.2.2.	Establecimiento en el medio de cultivo	34
5.3	Caracterización morfológica.....	35
5.3.1.	Identificación macroscópica y microscópica.....	35
5.4	Prueba de patogenicidad	37
5.4.1.	Bioensayo de patogenicidad	37
VI.	DISCUSIÓN	38
6.1.	Evaluación del sustrato	38
6.2.	Aislamiento de <i>Neopestalotiopsis</i>	39
6.3.	Caracterización morfológica.....	41
6.4.	Prueba de patogenicidad	43
VII.	CONCLUSIONES.....	44
VIII.	RECOMENDACIONES.....	45
IX.	REFERENCIAS	46
X.	ANEXOS	52
A.	Análisis estadístico de mortalidad	52
B.	Análisis estadístico de Diámetro de Corona.....	52
C.	Análisis estadístico de Área foliar	53
D.	Análisis estadístico de Número de hojas	54
E.	Análisis estadístico de Medios de cultivo.....	54
F.	Análisis estadístico de grado de infección en coronas	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Escala visual del grado de infección de coronas de frutillas inoculadas con <i>Neopestalotiopsis</i>	29
Tabla 2. Morfología macroscópica y microscópica del hongo patógeno en medio PDA.....	36
Tabla 3. Morfometría de conidios de <i>Neopestalotiopsis</i> obtenidas de un medio de cultivo PDA de 15 días.....	36
Tabla 4. Progreso visual del bioensayo de patogenicidad de <i>Neopestalotiopsis</i> cuya duración fue de 41 días.....	37
Tabla 5. Comparación morfométrica de <i>Neopestalotiopsis saprophyta</i> con la especie de <i>Neopestalotiopsis</i> aislada de Yaruquí en PDA a los 15 días.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Evaluación de la mortalidad en diferentes sustratos. Comparación de la diferencia porcentual entre los conteos observados y los esperados de los sustratos utilizando Chi-cuadrado ($*p < 0.05$) en Minitab19. 30
- Figura 2.** Evaluación del diámetro de la corona de frutillas sembradas en diferentes sustratos. Influencia del tipo de sustrato en el diámetro de la corona de frutilla medido en centímetros. La diferencia estadística se basó en un ANOVA y prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) realizados en Minitab19. 31
- Figura 3.** Evaluación del área foliar de frutillas sembradas en diferentes sustratos. Influencia del tipo de sustrato en el área foliar de planta de frutilla medido en centímetros. La diferencia estadística se basó en un ANOVA y prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) realizados en Minitab19. 32
- Figura 4.** Evaluación del número de hojas nuevas de frutillas sembradas en diferentes sustratos. Influencia del tipo de sustrato en número de hojas nuevas en la planta de frutilla medido en unidades. La diferencia estadística se basó en un ANOVA y prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) realizados en Minitab19. 33
- Figura 5.** Sintomatología de la enfermedad en campo. (A) Camas de frutilla variedad Albión. (B) Enfoque cercano de planta enferma. (C) Hojas con diferente daño foliar. 34
- Figura 6.** Comparación de planta sana (A) y planta enferma (E) variedad Albión se referencia la escala visual con una regla de 30 cm. En el lado izquierdo se presenta hojas sanas (B), corona sana con corte longitudinal (C) referenciando su tamaño con una moneda de 50 ctvs. y raíz con desarrollo normal (C). En el lado derecho se presenta hojas con la sintomatología de infección (F), corona enferma con corte longitudinal (G) referenciando su tamaño con una moneda de 50 ctvs. y raíz con escaso desarrollo (H). 34
- Figura 7.** Evaluación del crecimiento de micelio en diferentes medios de cultivo incubados a 25°C. Comparación la diferencia porcentual entre los conteos observados y los esperados de los medios de cultivo utilizando Chi-cuadrado ($*p < 0.05$) en Minitab19... 35
- Figura 8.** Grado de infección de las coronas de frutilla debido a inoculación con *Neopestalotiopsis*. Grado de infección de las plantas en cada tratamiento con base en la longitud decolorada de las coronas. Donde grado 0 corresponde al 0% de decoloración

en la corona, grado 1 a infección menor al 25%. grado 2 a un rango desde 25-75% y grado 3 a decoloraciones mayores del 75%. El análisis estadístico se basó en un Chi-cuadrado entre el grupo de control y el inoculado (p variable) en Minitab19.....38

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La frutilla o fresa es una de las frutas más demandadas a nivel mundial debido a su calidad sensorial, es decir apariencia, olor y sabor. Esta fruta tiene una porción comestible del 95% el cual tiene un peso de 150 gramos. El 85,33% de la porción promedio previamente descrita es agua. Presenta un contenido medio a bajo de energía alrededor de 57 kilocalorías (kcal) e hidratos de carbono con un 7% del peso. Los hidratos de carbono con mayor relevancia dentro del fruto son; fructosa, glucosa y xilitol. La frutilla es una fuente importante de vitamina C, fósforo y calcio manifestando en una porción promedio de fruta de 85.5 mg, 37.1 mg y 35.6 mg respectivamente (Valero, y otros, 2018).

En el 2018 se estimó que la producción mundial de fresas fue de alrededor de 8 millones de toneladas las cuales se distribuyen principalmente entre Asia (46.6%), América (26.1%) y Europa (20.2%). El principal productor de fresas en el mundo es China, país que produce alrededor de alrededor de 3 millones de toneladas anuales (35.4% de la producción mundial). Estados Unidos es el segundo país con mayor producción con 1,2 millones toneladas, lo que corresponde a 15.5% de la producción mundial, seguido de México con 0,7 millones de toneladas correspondiendo al 7.8% de la producción mundial. Turquía, Egipto, España, República de Corea y Rusia también son productores importantes de frutilla, pero no representan un volumen importante. Los principales importadores de fresa hasta el 2018 fueron; Alemania, Francia, Canadá, Estados Unidos y Reino Unido. En total estos países importan anualmente 386,000 toneladas (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2018).

El cultivo de frutilla se concentra mayormente en la parte andina del Ecuador; en las zonas donde se presentan una altitud de 1200 a 3000 msnm. Por lo tanto, la provincia de mayor producción de frutilla en el país es Pichincha. Aunque no existen datos estadísticos oficiales de esta provincia, pero se estima que se producen alrededor de cinco mil cajas de cuatro kilogramos de frutilla en forma diaria (Masapanta, 2014). En la provincia de Pichincha la mayor producción de frutilla se cultiva en el cantón Quito especialmente en las parroquias; Yaruquí, Pifo, Tababela, Checa, Quinche, Ascázubi (Chávez-Rey, 2019). La producción de frutillas cubre el 60% de las necesidades de consumo interno del país, y tan solo el 40% se exporta especialmente como frutilla fresca o procesada en almíbar hacia Estados Unidos, Países Bajos y España (Curillo-Dávila, 2015). El rendimiento de frutilla en el Ecuador es de 15.6 toneladas por cada hectárea cultivada, y hasta el año 2018 el Ecuador ha tenido una producción estimada de 1,450 toneladas a nivel nacional en 91 hectáreas de cultivo (FAO, 2018).

Considerando en retrospectiva el cultivo de frutilla desde 2010 hasta el 2018, la producción y las hectáreas cosechadas de esta fruta han ido disminuyendo anualmente al 6% (FAO, 2018). Esto se debe principalmente a la susceptibilidad a la enfermedad de las frutillas llamada pudrición de la corona, la cual se ha presentado en las zonas de Yaruquí, Quinche y Huachi (Guevara-Andrade, 2015; Tapia-Sopalo, 2015). Esta susceptibilidad de la corona es causada por un hongo de la división ascomiceta, denominado *Neopestalotiopsis*. Este hongo provoca que la vida útil del cultivo se vea reducida aproximadamente a 6 u 8 meses, es decir se reduce un 46% (Campaña, 2019; Vizcaino, 2011). Adicionalmente, el rendimiento por hectárea del cultivo de frutillas se ve afectado en un 50-70%

debido a esta enfermedad. Todos estos factores inciden en la factibilidad económica para la implementación del cultivo con escasa retribución a la inversión de capital inicial (Verdugo, 2011).

1.2 Justificación

El sector agropecuario del Ecuador es de suma importancia, ya que aporta a la economía interna (PIB) en un 8%. Este sector requiere de gran apoyo para poder impulsar todo su potencial. Así mismo, el 22% de la población rural tiene un sustento monetario fijo y estable, debido a su actividad en la agricultura (MAG, 2018). Los agricultores que dependen de la producción y comercialización de frutilla venden a \$2.00/kilo un precio relativamente bajo que requiere de volumen para obtener ganancias; al perder volumen al enfrentarse con la nueva enfermedad que produce pudrición en la corona en consecuencia se restringen los ingresos de los productores. La inversión inicial que se requiere para implementar un cultivo de frutilla es de \$2,600 y debido a la baja rentabilidad la retribución y pago de la inversión inicial se dificulta (Rodas-Ramón y Tituana-Tituana, 2012).

La susceptibilidad de las frutillas a la pudrición de las coronas en las fresas en consecuencia provoca el uso indiscriminado de agroquímicos de amplio espectro. La frutilla comercializada en Pichincha en el 2015 contenía en su corteza concentraciones más elevadas a los límites máximos residuales de la EFSA (European Food Safety) de piretroides, carbamatos y cipermetrinas. Lo cual, afecta gravemente a la salud del consumidor ya que estos agroquímicos son sistémicos y aunque las frutas se laven no se puede retirar las cantidades residuales de forma eficiente. El agricultor también se ve afectado por los agroquímicos ya que tiene contacto directo con los mismos y en su mayoría no presentan la protección adecuada al momento de fumigar (Curillo-Dávila, 2015).

En edad infantil los niños consumen grandes porcentajes de frutas y verduras en sus dietas diarias, debido a su palatabilidad y fácil digestión. Este segmento de consumidores de frutillas son los más afectados con el exceso al límite permitido residual toxicológico, principalmente debido a que no han alcanzado el desarrollo completo de su sistema digestivo. Por lo tanto, el excedente residual que se acumula en la pulpa de la frutilla es una dosis proporcionalmente alta considerando el peso corporal (Castillo Jumbo, 2013). Según el Consejo de Defensa de Recursos Naturales (CDRN, 2016) existe una tendencia del 50% a que los niños que han estado expuestas a cantidades residuales de agroquímicos por tiempos prologados desarrollen cáncer en la edad adulta. Con base en este estudio se espera identificar el agente causal de la pudrición a la corona enfocando el control químico más eficiente para este patógeno, evitando uso de fungicidas de amplio espectro.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cultivo de Frutilla

2.1.1 *Taxonomía y Fisiología*

La frutilla o fresa proviene de la familia Rosaceae, el cual se encuentra dentro de la clase Rosales y este en el orden Magnoliopsida. Esta familia, tiene como característica principal las estipulas que protegen la zona axilar del peciolo en cada hoja (Nabors, 2006). La frutilla es una planta rastrera y perenne que tiene una vida útil alrededor de 18 meses (Guevara-Andrade, 2015). La frutilla tiene un pseudo tallo que se denomina corona la cual encierra yemas vegetativas de las cuales se desarrollan las hojas trifoliadas en forma espiral (roseta basal) y los estolones (Strik, 2013). Los peciolos de las hojas son alargados y presenta tallos

florales que no presentan hojas, en cuyo ápice se producen las flores hermafroditas y auto compatibles. Las flores son pentámeras, es decir, que contiene cinco sépalos y pétalos. El fruto se produce después de la autopolinización, generando un fruto carnoso de tipo pseudocarpo (Tapia-Sopalo, 2015).

La frutilla tuvo una hibridación somática en 1759, cuando los colonizadores llevaron plantas de frutilla desde Sur América hacia Europa. Este proceso se realizó de forma no intencional en Gran Bretaña. La hibridación se produjo por polinización cruzada, creando un fruto más carnoso y con mejor aroma que las frutillas que existían en la época. La primera descripción de esta especie se presentó en 1766 en el diccionario de Gardeners escrito por Phillip Miller (Bonet Gigante, 2010). Este híbrido se ha mantenido de forma comercial en el mercado debido a que su reproducción por estolones ayuda a mantener las características de vigorosidad y alta producción de generación en generación (Fuller, y otros, 1994).

Los cultivares de frutilla se han adaptado a las diferentes condiciones de latitud, patrones climáticos y fotoperiodo. Esta adaptación a las condiciones ambientales ha desarrollado dos categorías de frutillas dispersas por el mundo. A la primera categoría corresponden las frutillas June-Bering, conocida en países de leguaje hispano como frutillas de día corto. Estas frutillas necesitan de menor cantidad de luz solar para activar la producción de yemas florales que desarrollaran fructificación en el hemisferio norte a finales del mes de junio. Por lo tanto, este tipo de frutilla produce las yemas florales una vez al año provocando un solo período de cosecha en verano (Strik, 2013). La segunda categoría de frutillas son las de día neutro, las cuales no requieren principalmente de un fotoperíodo para determinar su producción de yemas florales. Sin embargo, la

temperatura es indispensable para activar la generación de yemas vegetativas y florales (Finn, y otros, 2014). Las frutillas de día neutro precisan de temperaturas alrededor de 7-10°C para incrementar la producción vegetativa, 27°C para diferenciar las yemas florales y mayor a 28 °C para generar estolones (Villagrán, y otros, 2013).

La plántula de variedad Albión que se cultiva en el país se importa desde empresas propagadoras en Chile o California. Esta variedad tiene buena aceptación para venta como fruta fresca y procesados puesto a que presenta mayor cantidad de sólidos solubles, obteniendo de 10 a 14 °Brix (Llumiquinga Quishpe, 2017). El fruto tiene forma cónica y color rojo intenso, a temperaturas templadas puede presentar colores más claros hacia las hojas. Esta variedad es demandada por la firmeza y uniformidad del fruto. Adicionalmente, estas características ayudan a que soporte mayor tiempo en percha siempre y cuando se la maneje bajo los parámetros de conservación adecuados (4°C; HR:85-95%). Albión tiene además resistencia a la enfermedad producida por Oídio (*Podosphaera aphanis*). En promedio esta variedad puede ser plantada a 27 cm entre plantas obteniendo alrededor de 62,000 plantas por hectárea de las cuales cada planta produce aproximadamente 1,200 gramos en el ciclo de cultivo (Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), 2017).

2.1.2 Manejo agronómico

El cultivo de frutilla debe establecerse en un terreno nuevo o posterior a una rotación con cereales y/o leguminosas, respectivamente. Por otro lado, los cereales se recomiendan porque no se ven directamente perjudicados por las enfermedades que presentan las frutillas. Por otra parte, las leguminosas fijan nitrógeno al suelo, lo cual puede reducir las enmiendas que requiere aplicar el

agricultor a futuro en este cultivo tan demandante de este macroelemento (Silva, y otros, 2015). No se recomienda utilizar terrenos previamente utilizados en la siembra de solanáceas puesto a que el suelo puede tener esencialmente presencia de *Fusarium* sp., agente fúngico que también afecta a las frutillas (Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI), 2015).

El suelo se debe preparar un mes antes de la siembra. Se debe realizar un análisis de suelo para determinar estructura y textura del suelo, cantidad de nutrientes presentes en el mismo, pH y materia orgánica. De ser necesario se realizan enmiendas en el suelo para regular pH y materia orgánica (óptima alrededor de 3%-5%) (INIA, 2017). Arar el suelo es la primera labor cultural que se realiza, con la finalidad de aflojar la tierra compactada generando aeración. Este proceso facilita la construcción de las camas de cultivo que tienen normalmente 40 cm de alto y desde 80 a 120 cm de ancho. Los caminos entre camas pueden tener desde 50 cm hasta 80 cm dependiendo de la capacidad de mecanización. El sistema de riego por goteo es el más recomendado para evitar enfermedades fungosas, este se instala en doble hilera sobre las camas antes de cubrirlas con el plástico negro. Emplasticar las camas tiene beneficios como aumentar la temperatura del suelo y reducir malezas (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 2017).

Las frutillas se propagan por medio de plántulas, material vegetativo que proviene de estolones de la planta madre. Este material se siembra a doble hilera con 25 cm -30 cm de distancia entre plantas. Otra labor cultural importante es la realización de podas. Se requiere eliminar los brotes florales iniciales del cultivo, estolones presentes y hojas viejas, ya que así, se promoverá el desarrollo vegetativo foliar, incremento del diámetro de corona y eliminará posibles

hospederos de enfermedades, respectivamente. Esta actividad debe realizarse con herramientas limpias y desinfectarlas en cada corte, evitando lastimar a la corona al realizar el proceso (Ávila Cubillos, 2015).

Las principales plagas del cultivo de frutilla son los trips, ácaros, mosca blanca y trozadores. Estas plagas afectan a la inflorescencia y hojas reduciendo el rendimiento del cultivo. El control más recomendado es un manejo integrado utilizando, por un lado, insecticidas como spinosad, abamectina, acetamiprid, entre otros, y, por otro lado, microorganismos benéficos como *Beauveria bassiana*, *Phytoseiulus persimilis*, *Trichogramma* sp, entre otros. Las enfermedades a las que está más vulnerable el cultivo de frutilla son *Botrytis cinerea*, *Collectotrichum fragariae*, *Phytophthora* sp. y *Mycosphaerella fragariae*. Las dos primeras enfermedades afectan directamente al fruto en desarrollo, la tercera afecta al sistema radicular y parte del pseudotallo de la frutilla (corona), mientras que la última presenta su sintomatología en las hojas. El manejo que se promueve en los casos de infección es integrado. Los tratamientos químicos pueden tener benomyl, thiabendazole, azoxystrobina como ingredientes activos, mientras que el tratamiento biológico se puede manejar con inoculación de *Trichoderma* sp. o *Bacillus subtilis* (Agrios , 2005).

La cosecha de las frutillas es de forma progresiva en general de 20 a 25 días después de la floración se pueden recoger los frutos. Sin embargo, esta puede variar de acuerdo con la temperatura promedio en la cual se desarrollen las plantas. La recolección de los frutos se debe realizar a primeras horas del día para evitar la deshidratación y pudrición de la misma (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), 2015).

2.2 Neopestalotiopsis

Neopestalotiopsis es un género de la familia *Amphisphaeriaceae* proveniente de la división *Ascomiceta* en el reino *Fungi* comúnmente patógeno. Es considerado uno de los tres subgéneros de *Pestalotiopsis*. Su distribución es variada, pero prefiere el clima templado a tropical. La reproducción más frecuente de este hongo es por medio asexual. *Neopestalotiopsis* se podría clasificar como un hongo hemi-biotrófico debido a que tiene la facultad de cambiar las rutas nutricionales como mecanismo de sobrevivencia. Por lo tanto, es capaz de permanecer tanto en materia orgánica fresca como descompuesta (Maharachchikumbura, y otros, 2012).

Existen gran variedad de fenotipos en este género fúngico, por lo que se debe recurrir a la similitud morfológica en los conidios tanto para agrupar al género como subdividirlo por especies. La agrupación por especies se basa en el largo y ancho de conidios, número de septos, color de septos, número y largo de flagelos (Maharachchikumbura, y otros, 2014). Presenta estructuras protectoras para los conidios denominadas conidiomas (Agrios, 2005). El tipo de conidioma en este género puede ser variable dependiendo de la especie desde un acérvulo hacia un picnidio reconocible a simple vista como puntos de color café oscuro a negro (Maharachchikumbura, y otros, 2011). De forma general, el género *Neopestalotiopsis* tiene conidios cilíndricos que miden alrededor de 22 a 30 micrómetros (μm) con una leve curvatura en los extremos. Presenta septos que pueden ir desde 1- 4 por conidio. El color característico de los septos intermedios es café oscuro a olivo semitransparente mientras que el color de las células externas es hialinas o transparentes (Jeewon, y otros, 2002). Los conidios tienen de 1 a 4 apéndices basales y 1 apéndice apical (Obregón, y otros, 2018).

La diseminación de la enfermedad puede producirse por el viento y el agua hacia plantas sanas (Campaña, 2019). Por lo tanto, en la época de lluvia se encuentran mayor cantidad de plantas afectadas, ya que los conidios tienen flagelos que le ayudan a movilizarse más rápido en medios líquidos. Las plantas enfermas presentan poco desarrollo vegetativo, coloración intervenal rojizomarrón desde ápice y el peciolo de hojas nuevas, marchitez color pardo oscura en hojas y tallos, la necrosis total es la última fase de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* sp. (Bhagariya y Prajapati, 2019; Vu, 2007).

La presencia de *Neopestalotiopsis* en coronas enfermas de frutilla es un acontecimiento nuevo en el mundo. El primer reporte de identificación del patógeno en el cultivo de frutilla se realizó en España por Chamorro (2015). Cinco reportes adicionales fueron documentados en Bélgica, Bangladés, Italia, Uruguay y Argentina a partir del año 2017 hasta el 2019. En el Ecuador, desde el año 2015 se han reportado sintomatologías de la enfermedad *Pestalotiopsis* en las frutillas pertenecientes a las zonas productoras de Quito y Ambato. Sin embargo, la identificación molecular y morfológica del ascomiceto ha determinado únicamente hasta el nivel de género (Guevara, 2015)

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar si el hongo *Neopestalotiosis* es el agente causal de la pudrición de la corona en frutillas.

3.2 Objetivos Específicos

- Analizar el crecimiento y mortalidad de frutillas Albión en suelo contaminado y esterilizado en presencia o ausencia de cascarilla.
- Aislar y caracterizar morfológicamente mediante microscopía al patógeno causante de la pudrición de la corona en frutilla.
- Realizar el ensayo de patogenicidad del aislado proveniente de coronas de frutillas infectadas en campo.

3.3 Hipótesis

- *Neopestalotiopsis* es el agente causal que provoca pudrición de la corona en las frutillas de la zona de Yaruquí.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Condiciones del experimento

La investigación fue realizada desde el 1 de noviembre del 2019 hasta el 1 de enero del 2020. El experimento se ubicó en el invernadero de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) el cual tiene una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 3$ y $80\% \pm 10$ de HR (Datos obtenidos de Data Logger RC-61). Dentro de este período se realizó el riego manual (80-100 ml) a las plantas de frutilla pasando un día, la fertilización se programó una vez a la semana con la solución de Steiner, y podas de acuerdo con las necesidades y desarrollo de las plantas (Juárez y otros, 2007).

4.2 Evaluación del sustrato

4.2.1. *Recolección y desinfección del suelo.* - El suelo agrícola empleado en el experimento se obtuvo de una finca productora de frutillas variedad Albión en la parroquia de Yaruquí, cantón Quito, provincia Pichincha cuyas coordenadas son latitud -0.163228 y longitud -78.328259. En el lugar se extrajo 55 kilogramos de tierra preparada para el inicio productivo de frutillas. Los 17 kilogramos de cascarilla de arroz requeridos se consiguieron alrededor de la misma zona en las coordenadas latitud -0.168141 y longitud -78.325949. La mitad de los materiales fueron separados en fundas individuales de 0.5 kilogramos y esterilizados en la autoclave del laboratorio de biotecnología agrícola y alimentos de la USFQ por 30 minutos a una temperatura de 121°C y 1 atmósfera de presión (Giampaoli, y otros, 2014).

4.2.2. *Diseño experimental e instalación del experimento.* - Todo el material fue tamizado para eliminar residuos vegetales no deseados. El diseño experimental que se utilizó fue un DCA con cuatro tratamientos y tres repeticiones, el experimento constó de 12 unidades experimentales ubicadas aleatoriamente en el invernadero de la USFQ. Cada unidad experimental constó de una maceta de 15 centímetros por 12 centímetros la cual se llenó con 1 kilogramo de sustrato. Los tratamientos se numeraron para la aleatorización como; suelo sin esterilizar, suelo esterilizado, suelo sin esterilizar más cascarilla y suelo esterilizado más cascarilla. Los tratamientos numerados como tres y cuatro deben ser incorporados en una relación 1:1 (Yáñez y Telenchana, 2018). Finalmente, las plántulas de frutilla variedad Albión importadas de Chile fueron sembradas el 1 de

noviembre del 2019 en los diferentes sustratos preparados (Ecuagroimport, 2017).

4.2.3. *Recolección de datos y Análisis estadístico.* – Las variables a medir para determinar la influencia del sustrato en las plántulas de frutilla variedad Albión en el experimento fueron mortalidad, diámetro de la corona, área foliar y número de hojas (Ameri y otros, 2012; Rostami y otros, 2014). La mortalidad se midió en porcentaje por medio de la contabilidad de las unidades experimentales muertas $\% = \frac{x*100}{12}$ los datos obtenidos en las mediciones se los ingresó de forma aditiva. El diámetro de la corona se midió con el uso de un calibrado o pie de rey, el cual genera datos en centímetros. El área foliar fue medida con una regla de 15 centímetros, el punto de inicio en la medición fue la base de uno de los foliolos hasta el ápice, este proceso se repitió tres veces una por cada foliolo, posteriormente se transformaron los datos con base en la fórmula $y = 0.8823x + 4.0761$ donde x representa la media de la longitud de los tres foliolos (Calderón y otros, 2013).

Los datos fueron recolectados dos veces con un intervalo de un mes, la primera recolección de datos se realizó 20 días después de la instalación del experimento. Debido a la naturaleza del experimento y su alta variabilidad los datos obtenidos fueron transformados usando el método de raíz cuadrada más 0.5. Los datos transformados fueron analizados en Minitab 2019 y las medias se compararon por medio de la prueba de Tuckey con un nivel de confianza de ($p < 0.05$) con excepción

de la variable mortalidad. La variable de mortalidad fue analizada por medio de un chi-cuadrado para asociación de medias con un valor $p < 0.05$.

4.3 Aislamiento de *Neopestalotiopsis*

4.3.1. *Sintomatología y recolección.* - La sintomatología de la enfermedad se caracteriza por presentarse en las hojas, las cuales tienen una coloración necrótica con tendencia rojiza en la zona intervenal y áreas marrones (óxido) en hojas viejas comenzando desde el ápice de la hoja hasta el peciolo en relación directa a la severidad de la infección (Obregón, y otros, 2018). Esta sintomatología fue reconocida en un lote de frutillas Albión con una superficie aproximada de 1600 m² ubicado en el sector de Yaruquí. En el lote se muestrearon al azar 5 plantas extrayéndolas desde la raíz. Se las etiquetó y almacenó cada una en una funda resellable dentro de una nevera portátil para transportarlas al laboratorio de Biotecnología agrícola y alimentos de la USFQ.

4.3.2. *Desinfección de las muestras.* - En el laboratorio se procedió a lavar con abundante agua las plantas para eliminar el remanente de tierra. Posteriormente, con la ayuda de una podadora se separaron las coronas (pseudotallos) de las plantas, se volvió a lavar las mismas con abundante agua y se las seco con papel previamente esterilizado. En la cámara de flujo laminar se cortaron las coronas en pequeños trozos de aproximadamente 10 mm con la ayuda de un bisturí estéril (Machín, 2017). Todos los trozos obtenidos fueron sumergidos en 2% de Hipoclorito de Sodio (NaClO) por 1 minuto, 70% de Alcohol por 1 minuto y enjuagados 3 veces con agua destilada estéril, en cada paso el exceso de líquido fue eliminado con papel estéril (Obregón, y otros, 2018).

4.3.3. *Preparación de medios de cultivo.* - Los medios de cultivos utilizados para aislar el patógeno fueron PDA, Sabouraud y Avena Agar (Centro Internacional de la Papa (CIP), 2004; Maharachchikumbura, y otros, 2014). En el laboratorio de biotecnología agrícola y alimentos de la USFQ se pesó el medio de cultivo en polvo de la marca DIFCO según las instrucciones del envase para realizar PDA y Sabouraud. En el caso del medio Avena agar se utilizó 30 gramos de avena molida y 20 gramos de Agar (Estrada y Ramír, 2019; Moreira, y otros, 2012). El material previamente pesado se mezcló e incorporó en un Erlenmeyer con 1 litro de agua destilada y un agitador magnético. Se utilizó la plancha agitadora para disolver el medio de cultivo a 60°C con 100 rpm. Cuando el medio de cultivo llegó a ebullición se retiró de la plancha agitadora y se lo llevó a la autoclave con la tapa semiabierta. Se esterilizó el material a 121°C por 20 minutos a 1 atm. Al finalizar el proceso de esterilización se esperó que los frascos que contienen los medios de cultivo se enfríen quedando a temperatura ambiente para incorporar 160 mg/ml de gentamicina evitando la contaminación bacteriana. Finalmente, se dispensaron 20 ml del medio en cada caja Petri (CIP,2004).

4.3.4. *Siembra de material vegetal.* - Se esterilizaron 21 explantes provenientes de las 5 plantas obtenidas en campo y se los dividió en grupos de 7 en forma aleatoria para utilizar los tres diferentes medios de cultivo. Cada explante se sembró en la mitad de una caja Petri con uno de los tres medios de cultivo dentro de la cámara de flujo con el mechero encendido. Cada caja Petri fue sellada con Parafilm y etiquetada. Se almacenaron las

cajas por 2 días en la incubadora a 25°C (Bhagariya y Prajapati, 2019). Posteriormente, se aisló el micelio blanco algodonoso presente y se lo replicó en otras cajas Petri con el mismo medio de cultivo del cual provenía. Se mantuvieron las réplicas en la incubadora a 25°C por 12 días (Essa, y otros, 2018). Al finalizar el plazo se desecharon las cajas Petri que presentaban morfología diferente (CIP,2004).

4.3.5. *Recolección de datos y Análisis estadístico.* – Los datos fueron recolectados una sola vez a los 7 días de haber sembrado los explantes en cada uno de los medios correspondientes (PDA, Sabouraud y Avena Agar). El conteo de cajas Petri que presentaban presencia o ausencia de micelio algodonoso fue ingresado al programa Minitab 19, donde se realizó una prueba de chi-cuadrado para asociación de medias con valor $p < 0.05$.

4.4 Caracterización morfológica

4.4.1. *Identificación morfológica del hongo.* A los 12 días del aislamiento el hongo tiene un crecimiento diametral predominante. El hongo necesita de exposición a luz negra por 3 a 7 días para generar esporas (Campaña, 2019). Se registro el color, tipo de crecimiento y morfología de la colonia en el anverso y reverso de la caja Petri (Essa, y otros, 2018). Los conidios se extrajeron desde los conidiomatas raspando con un palillo y disolviendo el contenido en 300 µl de agua destilada estéril sobre un portaobjetos (Maharachchikumbura, y otros, 2012). La suspensión se mantuvo estática con el uso de cinta adhesiva para posteriormente ser visualizada en el microscopio a 400X y 1000X. Se realizaron mediciones a 30 conidios para determinar el largo, ancho basal y apical, número y longitud de segmentos,

número y longitud de apéndices basales y apicales, colores de los segmentos centrales (Maharachchikumbura, y otros, 2011). Se utilizó un microscopio con cámara fotográfica y software Leica para medir las estructuras relevantes de los conidios.

4.5 Prueba de patogenicidad

4.5.1. *Bioensayo de patogenicidad.* - Se realizó con 15 plantas de frutilla variedad Albión por sustrato (suelo más cascarilla estéril, suelo más cascarilla no estéril, suelo agrícola estéril, suelo agrícola no estéril). En cada tratamiento 3 plantas se utilizaron como control. La suspensión de esporas se preparó con base en el medio Avena Agar de 15 días después de la siembra esporulados en luz negra (Dung, y otros, 2016). Se vertió 1 ml de PDB en el medio de cultivo, después la superficie del medio se raspó para extraer las esporas y la solución resultante se filtró en algodón para eliminar los fragmentos del micelio. El inóculo utilizado presentaba una concentración 1×10^4 ml⁻¹ esporas del patógeno (Hemelrijck, y otros, 2016).

Seis milímetros de la solución resultante se esparcieron con la ayuda de un atomizador alrededor de las coronas heridas. En los controles se esparció PDB sin patógeno (Sigillo y otros, 2020). La inoculación se realizó dos veces en el experimento (Park y otros, 2019). Posteriormente, se analizó la susceptibilidad de los diferentes sustratos al patógeno evaluando el grado de descoloración de las coronas para lo cual se midió el largo de la corona total (X_1) y la longitud de la mancha necrótica debido a la infección (X_2). Utilizando la fórmula $\frac{X_2}{X_1} * 100$ se puede dividir a las

coronas decoloradas de acuerdo con el grado de infección (Tabla 1) siendo el grado 0 correspondiente al 0% de decoloración en la corona, grado 1 a infección menor al 25%. grado 2 a un rango desde 25-75% y grado 3 a decoloraciones mayores del 75% (Hemelrijck, y otros, 2016). Adicionalmente, con base en los postulados de Koch se examinó la presencia del patógeno en el tejido de las coronas provenientes de los sustratos estériles por medio del re-aislamiento en PDA (Bhagariya y Prajapati, 2019).

Tabla 1. Escala visual del grado de infección de coronas de frutillas inoculadas con *Neopestalotiopsis*.

Grado	Rango	Fotografías de Severidad			
0	0%				
1	< 25%				
2	25-75%				
3	>75%				

4.5.2. *Recolección de datos y Análisis estadístico.* – Los datos fueron recolectados una sola vez a los 41 días de haber iniciado el bioensayo de inoculación del patógeno. El grado de infección de las coronas de cada sustrato fue analizado con una prueba de chi-cuadrado por el programa estadístico Minitab 19 basándose en un valor $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

5.1 Evaluación del suelo

5.1.1. *Mortalidad.* - Con base en la prueba de chi-cuadrado se presentó una probabilidad de valor $p < 0.01$ (Anexo A), por lo cual existe diferencia significativa entre los tratamientos de sustrato. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa “Los diferentes sustratos presentan diferentes porcentajes de mortalidad en las plantas”. En la prueba de Chi-cuadrado para asociación se muestra que los tratamientos suelo + cascarilla esterilizado, suelo agrícola esterilizado y suelo +cascarilla sin esterilizar poseen tanto menor mortalidad como mayor cantidad de plantas vivas que el promedio de los tratamientos. Por el contrario, a lo expuesto previamente, el tratamiento suelo agrícola sin esterilizar posee mayor mortalidad y menor cantidad de plantas vivas que el promedio (Figura 1).

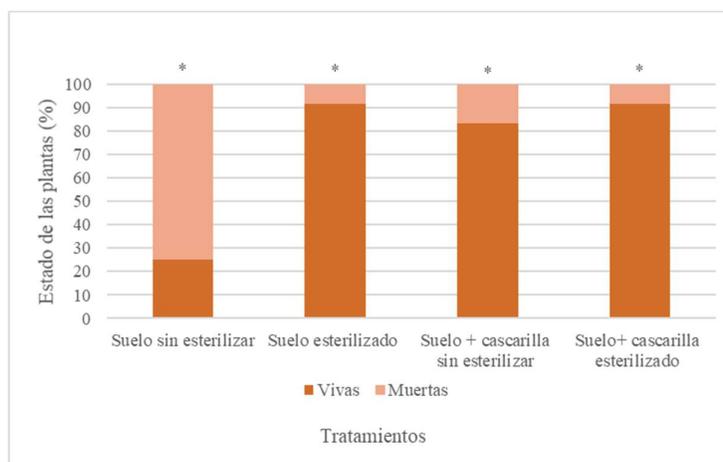


Figura 1. Evaluación de la mortalidad en diferentes sustratos. Comparación de la diferencia porcentual entre los conteos observados y los esperados de los sustratos utilizando Chi-cuadrado ($*p < 0.05$) en Minitab19.

5.1.2. *Diámetro de la corona.* – Según el valor F del ANOVA (Anexo B) esta variable si presentó diferencia significativa entre los tratamientos de sustrato. Es por lo que se acepta la hipótesis alternativa “Los diferentes sustratos provocan diámetros de la corona distintos en las plantas de frutilla”. Al realizar la prueba de Tuckey se determinó que el tratamiento con diámetro de corona mayor fue suelo + cascarilla esterilizado, compartiendo el mayor rango estadístico únicamente con suelo + cascarilla sin esterilizar. De igual modo suelo + cascarilla sin esterilizar también comparte rango estadístico con suelo agrícola esterilizado. El tratamiento que obtuvo el diámetro de corona más pequeño fue suelo agrícola sin esterilizar (Figura 2).

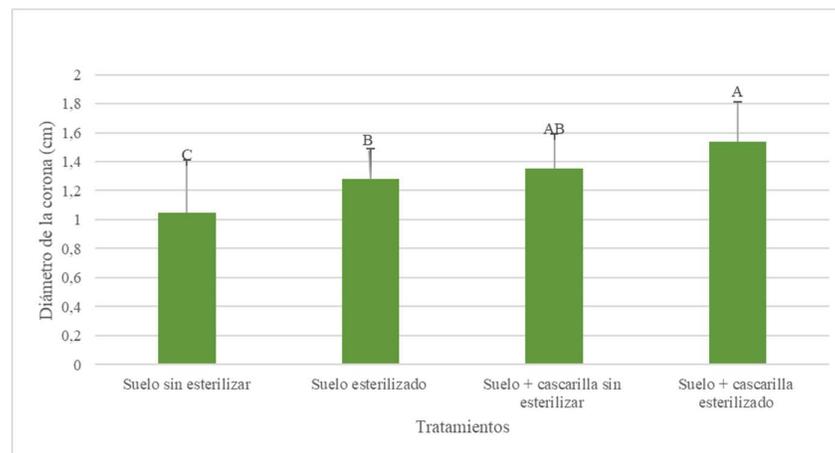


Figura 2. Evaluación del diámetro de la corona de frutillas sembradas en diferentes sustratos. Influencia del tipo de sustrato en el diámetro de la corona de frutilla medido en centímetros. La diferencia estadística se basó en un ANOVA y prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) realizados en Minitab19.

5.1.3. *Área foliar.* – Con referencia al valor F del ANOVA (Anexo C) esta variable sí presentó diferencia estadística significativa entre los tratamientos. En consecuencia, la hipótesis alternativa fue aceptada “Los diferentes sustratos influyen en el área foliar de las plantas de frutilla”. La prueba de Tuckey señaló que el sustrato con mayor área foliar fue Suelo

+ Cascarilla esterilizado, seguido de Suelo + Cascarilla sin esterilizar, y Suelo agrícola esterilizado respectivamente. El sustrato Suelo sin esterilizar presentó la menor área foliar de todos los tratamientos (Figura 3).

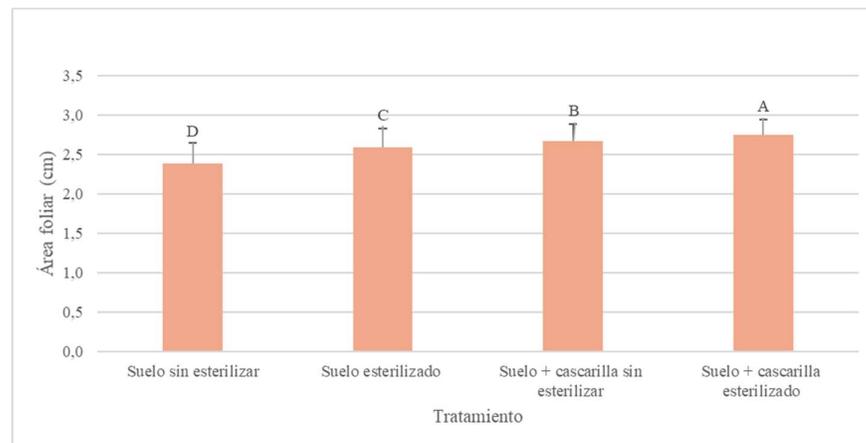


Figura 3. Evaluación del área foliar de frutillas sembradas en diferentes sustratos. Influencia del tipo de sustrato en el área foliar de planta de frutilla medido en centímetros. La diferencia estadística se basó en un ANOVA y prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) realizados en Minitab19.

5.1.4. *Número de hojas.* – El valor F del ANOVA (Anexo D) realizado expresó que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. Por consiguiente, se aceptó la hipótesis alternativa “Los diferentes sustratos afectan al número de hojas de las plantas de frutilla”. Con fundamento en la prueba de Tuckey se estableció que las plantas en el tratamiento Suelo + Cascarilla esterilizado presentaron la mayor cantidad de hojas del ensayo. De forma consecutiva se encuentran los tratamientos Suelo + Cascarilla sin esterilizar y Suelo agrícola esterilizado. Finalmente, las plantas del tratamiento Suelo sin esterilizar fueron las que menor cantidad de hojas presentaron en el experimento (Figura 4).

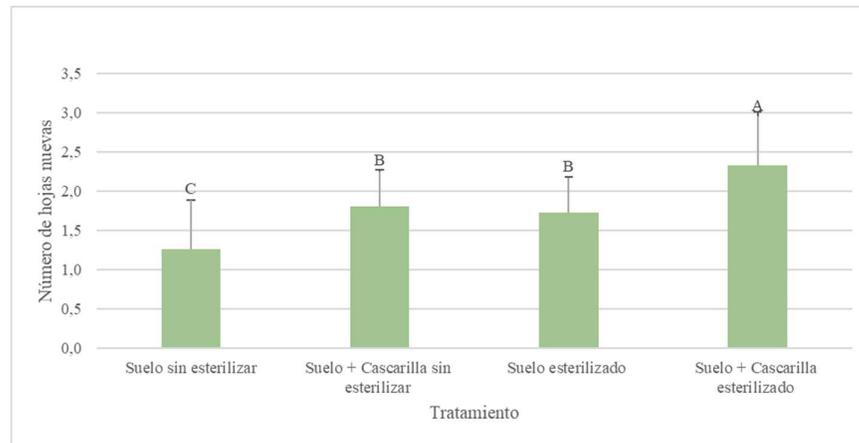


Figura 4. Evaluación del número de hojas nuevas de frutillas sembradas en diferentes sustratos. Influencia del tipo de sustrato en número de hojas nuevas en la planta de frutilla medido en unidades. La diferencia estadística se basó en un ANOVA y prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) realizados en Minitab19.

5.2 Aislamiento de *Neopestalotiopsis*

5.2.1. *Identificación de sintomatología.* – Se observó en el campo de frutillas una tasa de mortalidad aproximadamente mayor al 70% en la variedad Albión (Figura 5). Ciertas plantas de frutilla mostraban una necrosis intervenal de coloración café rojiza en las hojas nuevas, mientras que las hojas viejas manifestaban un color café-óxido. Ambas afecciones provenían desde el ápice hacia la base de las hojas. Al analizar una planta sana comparándola con las afectadas con la sintomatología previa, se determinó que las plantas con hojas rojizas poseían raíces de un color café oscuro y escasas raíces secundarias. Al diseccionar las coronas, la planta de frutilla estudiada exhibía manchas no concéntricas color café rojizo a café oscuro. Finalmente, se evidenció menor desarrollo vegetativo de la planta afectada (Figura 6).



Figura 5. Sintomatología de la enfermedad en campo. (A) Camas de frutilla variedad Albión. (B) Enfoque cercano de planta enferma. (C) Hojas con diferente daño foliar.



Figura 6. Comparación de planta sana (A) y planta enferma (E) variedad Albión se referencia la escala visual con una regla de 30 cm. En el lado izquierdo se presenta hojas sanas (B), corona sana con corte longitudinal (C) referenciando su tamaño con una moneda de 50 ctvs. y raíz con desarrollo normal (D). En el lado derecho se presenta hojas con la sintomatología de infección (F), corona enferma con corte longitudinal (G) referenciando su tamaño con una moneda de 50 ctvs. y raíz con escaso desarrollo (H).

5.2.2. *Establecimiento en el medio de cultivo.* - Los explantes sembrados en los tres diferentes medios de cultivo (Avena Agar, Agar Sabouraud y PDA) presentaron un valor $p=0.017$ (Anexo E) demostrando que existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos. Por lo tanto, se aceptó la hipótesis alternativa “Los diferentes medios de cultivo afectan en el tiempo de desarrollo del hongo patógeno”. Con base en la figura 7 se puede analizar que el medio Avena Agar presentó mayor presencia del hongo que el promedio mientras que en el medio de cultivo

Agar Sabouraud ocurrió lo contrario. El medio PDA se mantiene de forma equilibrada entre el porcentaje de diferencia entre lo observado y esperado tanto para presencia como ausencia del hongo.

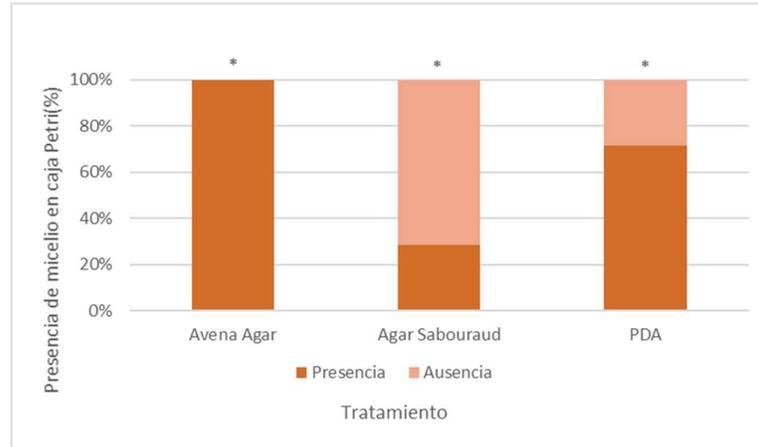


Figura 7. Evaluación del crecimiento de micelio en diferentes medios de cultivo incubados a 25°C. Comparación la diferencia porcentual entre los conteos observados y los esperados de los medios de cultivo utilizando Chi-cuadrado (* $p < 0.05$) en Minitab19.

5.3 Caracterización morfológica

5.3.1. *Identificación macroscópica y microscópica.* – El hongo patógeno se presentó en el anverso del medio PDA con un micelio blanco algodonoso y bordes ondulados. En el reverso de color amarilloso se logró visualizar conidiomas negros de forma dispersa. Los conidios presentados en escala (20 μm) son elipsoidales, multiseptados, presentan apéndices tanto basales como apicales, los septos externos hialinos y septos centrales con color desde café hacia olivo (Tabla 2). Al realizar la morfometría de 25 conidios con el microscopio se determinó que el tamaño promedio de las macrosporas es de $22,74 \pm 2,74 \mu\text{m}$ con un ancho de $5,27 \pm 0,75 \mu\text{m}$, presenta $4,77 \pm 0,72$ número de segmentos cuyo tamaño en promedio son

de $4,57 \pm 0,37 \mu\text{m}$ de largo. El número de apéndices apicales son $2,40 \pm 0,64$ con un largo promedio de $29,60 \pm 5,65 \mu\text{m}$ (Tabla 3).

Tabla 2. Morfología macroscópica y microscópica del hongo patógeno en medio PDA

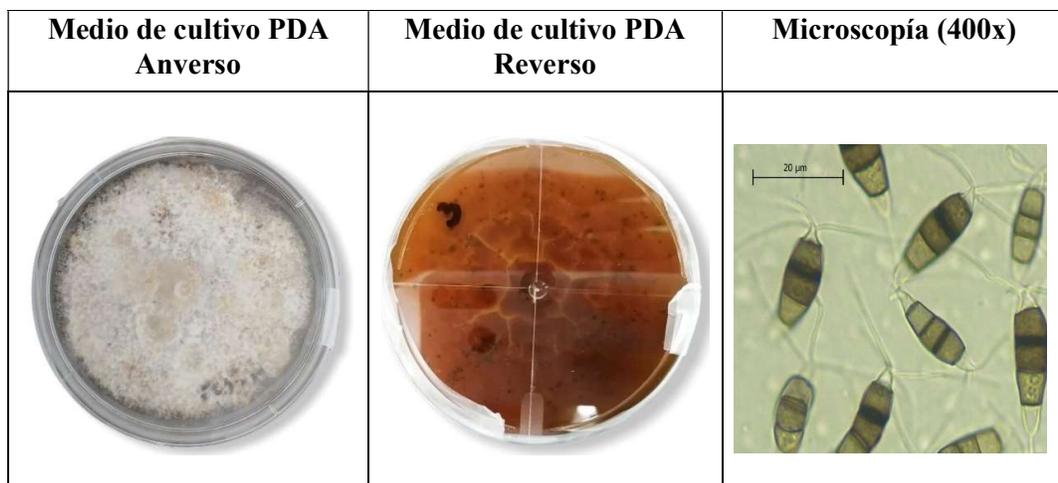


Tabla 3. Morfometría de conidios de *Neopestalotiopsis* obtenidas de un medio de cultivo PDA de 15 días.

Aislado	Tejido	Tamaño conidio (μm)		Número Segmentos	Tamaño de segmentos (μm)		Tamaño de los apéndices apicales (μm)	
		Largo	Ancho		Largo	Número de apéndices apicales	Largo	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	Cuello de la Frutilla	$22,74 \pm 2,74$	$5,27 \pm 0,75$	$4,77 \pm 0,72$ Rango: 4-6	$4,57 \pm 0,37$	$2,40 \pm 0,64$ Rango: 2-4	$29,60 \pm 5,65$	

5.4 Prueba de patogenicidad

5.4.1. *Bioensayo de patogenicidad.* – El grado de infección de las coronas mostró diferencias estadísticamente significativas (Anexo F) entre plantas expuestas a PDB (Control) y plantas expuestas a PDB + patógeno (Inoculadas) en cada uno de los diferentes sustratos (Tratamientos). Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa “La inoculación del patógeno causa decoloración en las coronas de frutilla”. Los controles de los tratamientos estériles son los únicos que en su totalidad no presentaron decoloración en la corona. Los tratamientos esterilizados e inoculados muestran mayor grado de decoloración en coronas que los tratamientos no esterilizados e inoculados. Los tratamientos con presencia de cascarilla e inoculados presentaron menor porcentaje de decoloración en las coronas que los tratamientos en ausencia de este material (Figura 8). El re-aislamiento del patógeno (postulado de Koch) fue exitoso (Tabla 4), obteniendo de las plantas inoculadas en condiciones controladas la misma morfología macroscópica y microscópica proveniente de coronas infectadas en campo.

Tratamiento	Inicial		Final	
	PDB	PDB + Patógeno	PDB	PDB + Patógeno
Suelo sin esterilizar				
Suelo esterilizado				
Suelo +Cascarilla esterilizado				
Suelo +Cascarilla esterilizado				

Tabla 4. Progreso visual del bioensayo de patogenicidad de *Neopestalotiopsis* cuya duración fue de 41 días.

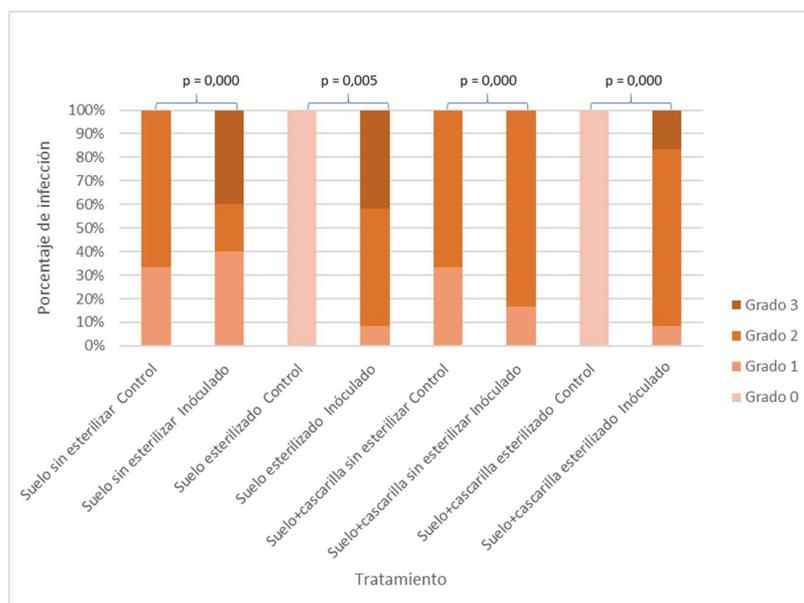


Figura 8. Grado de infección de las coronas de frutilla debido a inoculación con *Neopestalotiopsis*. Grado de infección de las plantas en cada tratamiento con base en la longitud decolorada de las coronas. Donde grado 0 corresponde al 0% de decoloración en la corona, grado 1 a infección menor al 25%. grado 2 a un rango desde 25-75% y grado 3 a decoloraciones mayores del 75%. El análisis estadístico se basó en un Chi-cuadrado entre el grupo de control y el inoculado (p variable) en Minitab19.

VI. DISCUSIÓN

6.1.Evaluación del sustrato

Según Matter y otros (2008), los terrenos en los que se sembró frutilla de forma intensiva con un mal uso de agroquímicos desinfectantes para suelo fueron degradados cambiando su estructura química y biológica. El suelo agrícola que se utilizó en el experimento proviene de una producción semi intensiva de frutillas con un manejo convencional para la desinfección del suelo. Las características propias de la estructura del suelo y el manejo continuo del mismo pudieron haber causado compactación en el suelo. La compactación del suelo consiste en menor capacidad de agua disponible para las plantas, la reducción de los espacios de aire y el aumento de la densidad en el suelo. En consecuencia, un suelo compactado

se mide bajo los parámetros de crecimiento vegetal y rendimiento del cultivo; debido a que dificulta el crecimiento de las raíces y la absorción tanto de agua como nutrientes necesarios para la fotosíntesis (Odey, 2018).

Este fenómeno explica la mortalidad y escaso desarrollo de las plántulas en los tratamientos con suelo agrícola (suelo agrícola esterilizado y no esterilizado). Mientras que los tratamientos con cascarilla de arroz (suelo + cascarilla tanto esterilizado como no esterilizado) presentaron mayor supervivencia y un desarrollo vegetativo (diámetro de la corona, número de hojas nuevas y área foliar) significativamente positivo. La adición de cascarilla de arroz en el suelo compactado aportó mayor aireación incrementando el espacio entre las partículas de suelo, buen drenaje y retención de la humedad (Yáñez y Telenchana, 2018).

Los tratamientos que presentan suelo sin esterilizar (suelo agrícola sin esterilizar y Suelo + cascarilla sin esterilizar) tienen menores mediciones en los parámetros de rendimiento (diámetro de corona, área foliar, número de hojas nuevas) en comparación con su tratamiento esterilizado respectivamente. Las plantas de los sustratos sin esterilizar tuvieron un retraso en el desarrollo a causa de la activación de mecanismos de defensa contra *Fusarium*, *Vorticillium*, *Neopestalotiopsis* (en mayor proporción) presentes en el suelo no esterilizado (Cárdenas, 2018; Guerra, y otros, 2020; Núñez, 2017).

6.2. Aislamiento de *Neopestalotiopsis*

La sintomatología de las frutillas en Yaruquí (alta mortalidad, bajo rendimiento, pudrición en la corona, coloración rojiza intervenal en hojas nuevas y color café-óxido en hojas viejas provenientes desde el ápice la base) es reportada tanto dentro del país en Huachi y El Quinche como a nivel mundial en Argentina,

España, Italia, India, Bangladesh, Uruguay, Vietnam, Corea del Sur, México y Egipto. En todos los casos se realiza una siembra del patógeno utilizando las coronas de plantas con la sintomatología previa corroborando la metodología que se utilizó en el experimento (Bhagariya y Prajapati, 2019; Hemelrijck, y otros, 2016; Obregón, y otros, 2018; Park, y otros, 2019; Rebollar, y otros, 202; Sigillo y otros, 2020). La presencia de *Pestalotiopsis* en los aislados varía desde 44% hasta el 80%, con base en estos resultados, se estima que es el principal responsable de la pudrición de la corona, en consecuencia, se realizó un aislamiento del hongo con mayor vigorosidad en la caja Petri (Ara, y otros, 2017; Dung y otros, 2016; Essa y otros, 2018; Machín, 2017).

En relación con los medios de cultivo utilizados PDA es un medio de cultivo generalista para hongos entomopatógenos, es el medio más usado para aislamiento *in vitro* (Ara, y otros, 2017). Sabouraud es otro tipo de medio de cultivo utilizado principalmente porque no afecta la morfología típica de los hongos y contiene proteínas de interés para el desarrollo de entomopatógenos (CIP, 2004). Avena agar es un medio de cultivo nutritivo que se utiliza para fomentar el crecimiento de macrosporas (Sanfinfer y Torello, 2015). El mejor medio de cultivo para *Pestalotiopsis* es el PDA a una temperatura de 25°C a 28°C (Campaña, 2019; Park, y otros, 2019). Sin embargo, Maharachchikumbura, y otros (2014) utilizó Avena Agar a una temperatura de 25°C \pm 2 como medio de cultivo selectivo para *Pestalotiopsis*. En el presente estudio con el género *Neopestalotiopsis* concuerda con lo presentado por Maharachchikumbura y otros (2014), ya que los resultados demostraron que el medio Avena Agar a temperatura de 25°C provee de mayor nutrición al hongo desarrollándolo en menos tiempo (Rezusta, y otros 2007).

6.3. Caracterización morfológica

La morfología de *Pestalotiopsis* y géneros relacionados son muy variables dependiendo de su interacción con el medio causando estructuras homologas. Además, algunas especies pueden generar metabolitos que cambian la coloración del medio de cultivo con el tiempo (Jeeewon, 2003). La presencia de micelio algodonoso con márgenes ondulados en el anverso de la caja Petri de 12 días posterior a la siembra varía levemente con lo reportado por Sigillo y otros (2020). Al igual que en el ensayo de Dung, y otros (2016), el lado anverso se va oscureciendo con el paso de los días de blanco a beige. En el reverso se presenta un color amarillo ámbar que con los días cambia hacia una tonalidad oscura (Obregón, y otros, 2018). Los conidiomas (acérvulos) se diferencian de mejor manera desde el reverso.

Según Maharachchikumbura y otros (2011), los conidios presentan ciertas especificaciones que pueden ser usados para determinar la especie de *Pestalotiopsis* y géneros relacionados. Las características variables en los conidios dentro de un género y el otro son el tamaño del conidio (largo y ancho), coloración de los segmentos medios, número de segmentos, número y longitud de los apéndices apicales. En el 2019 Campaña realizó un análisis molecular de aislados provenientes de la misma producción de frutillas que este estudio con los marcadores ITS y β -tubulina con los cuales se determinó el agente causal como *Neopestalotiopsis saprophyta*. Según Maharachchikumbura y otros (2012), los conidios de *Neopestalotiopsis saprophyta* presentan un tamaño de 22-30 μm de longitud en promedio 24,9 μm , con 5 μm de ancho en promedio, un rango de 4-7 segmentos que presentan en promedio un largo de 5 μm , mayormente se muestran

3 apéndices de 27,3 μm de longitud. Con base en los datos se demuestra que los conidios provenientes de un PDA de 15 días se encuentran dentro de los rangos o alrededor de la media de cada parámetro presentados por Maharachchikumbura y otros (2012), por lo tanto, se asume que la especie de *Neopestalotiopsis* que afecta las áreas productoras de Yaruquí es *saprophyta* (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación morfométrica de *Neopestalotiopsis saprophyta* con la especie de *Neopestalotiopsis* aislada de Yaruquí en PDA a los 15 días.

Autor	Tejido	Tamaño conidio (μm)		Número Segmentos	Tamaño de segmentos (μm)	Número de apéndices apicales	Tamaño de los apéndices apicales (μm)
		Largo	Ancho		Largo		Largo
Hidrobo (2020)	Cuello de la Frutilla	22,74 \pm 2,74	5,27 \pm 0,75	4,77 \pm 0,72 Rango: 4-6	4,57 \pm 0,37	2,40 \pm 0,64	29,60 \pm 5,65
Maharachchikumbura Y otros (2012)	Cuello de la Frutilla	22-30 x=24,9	4-7 x=5	x=4 Rango:4-7	4,3-5,3 X=5	2-4 usualmente 3	23-35 x=27,3

La determinación de la especie por medio de morfometría debe ser corroborada con análisis moleculares exhaustivos debido a que la muestra de conidios puede no llegar a ser significativa para encontrar valores promedio cercanos a la realidad (Jeewon, y otros, 2002). Los análisis moleculares amplifican regiones específicas del ADN fúngico en el estudio de Maharachchikumbura y otros (2012), obtiene un 95% de exactitud al usar el marcador molecular *tef1* y un 90% al utilizar el marcador β -tubulina, sin embargo,

al utilizar ambos marcadores genéticos concatenados en un árbol filogenético obtiene una probabilidad de precisión más alta.

6.4. Prueba de patogenicidad

Después de 6 días de la inoculación se presentaron los primeros síntomas (hojas con coloración marrón rojiza intervenal), a los 12 días se presenciaban marchitez leve, hojas con áreas de color café-oxido y peciolo necrosados. La sintomatología fue progresando hasta cumplirse los 41 días, tiempo en el cual la mayoría de las plantas inoculadas con el patógeno presentaban alta tasa de mortalidad y marchitez. A comparación con otros bioensayos de *Neopestalotiopsis* el tiempo de finalización es corto para la concentración de conidios aplicado, sin embargo, la lesión realizada en las coronas y la doble inoculación adelantó los resultados esperados en 2-3 meses. Adicionalmente, es la primera vez que se utiliza plantas de 6 meses para utilizarlas en el bioensayo teniendo antecedentes del uso de plantines provenientes en frigoríficos o de tres semanas de edad (Chamorro, y otros, 2015; Hemelrijck, y otros, 2016). El re-aislamiento del patógeno concordó con los postulados de Koch para los sustratos estériles (Dung, y otros, 2016).

Las plantas tratadas con PDB sin patógeno (controles) estériles no presentaron grado de infección mientras que los controles sin esterilizar mostraron infección hasta de primer grado (<25%). Lo cual señalaría que el suelo contiene una cantidad importante de hongos patógenos que pueden mantener su ciclo de vida en el mismo utilizando alimento de material en descomposición en especial *Neopestalotiopsis* patógeno que se encuentra en mayor porcentaje en el suelo de donde se extrajo la tierra para el experimento (Cárdenas, 2018; Dung, y otros, 2017; INIA, 2003).

Los tratamientos esterilizados que posteriormente fueron inoculados poseen un mayor grado de infección que los tratamientos inoculados sin esterilizar esto se debe a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Al desarrollarse estas plantas en un medio con patógenos tuvieron que haber activado su sistema de respuesta hipersensible a la primera señal de ataque en un sitio específico (corona) evitando la muerte celular. Al mantenerse en ese sustrato se activaron las rutas metabólicas de Acido salicílico promoviendo la defensa química y evitando severidad en futuras infecciones para los tejidos sanos (Venegas-Molina, y otros, 2020).

Los tratamientos que tienen cascarilla de arroz en el sustrato esterilizado o no esterilizado que fueron inoculados presentaron un menor grado de infección en las coronas que los tratamientos inoculados que tienen únicamente el suelo. La compactación del suelo es un estrés abiótico al cual se somete la planta causando mayor desarrollo de la enfermedad (Maharachchikumbura, y otros, 2011). Adicionalmente, la cascarilla de arroz es una fuente de silicio que puede llegar a aportar alrededor del 13% del peso seco en este microelemento (Arcos, y otros, 2007). El silicio induce la resistencia de las plantas ante patógenos e insectos, debido al fortalecimiento de las paredes celulares y cambios bioquímicos (Castellanos, y otros, 2015).

VII. CONCLUSIONES

- El suelo sin esterilizar causó una alta tasa de mortalidad en las plantas, mientras que el suelo con presencia de cascarilla esterilizado y sin esterilizar presentan menor mortalidad ($\leq 10\%$) que los tratamientos en ausencia de este material.

- El medio Avena Agar obtuvo presencia de micelio con mayor rapidez que el resto de los tratamientos, sin embargo, en PDA se puede apreciar de mejor manera la morfología del patógeno. Ambos medios, por lo tanto, presentan buenas características para aislar el patógeno proveniente de las coronas de plantas enfermas de frutillas.
- La morfología del agente patógeno se asoció con *Neopestalotiopsis*, la morfometría de los conidios se puede asumir en asociación con *Neopestalotiopsis saprophyta*, pero se requieren estudios moleculares para corroborar la información.
- En las pruebas de patogenicidad, se observó la misma sintomatología que la reportada para el género *Neopestalotiopsis* desde el día 6 con la coloración rojiza intervenal hasta el día 41 con la mortalidad de los individuos de estudio.
- Los tratamientos con presencia de cascarilla inoculados presentan menor severidad en la decoloración de las coronas causadas por el patógeno que aquellos tratamientos en ausencia de cascarilla.

VIII. RECOMENDACIONES

- Determinar con un análisis de microbioma el porcentaje de carga microbiana que existe de *Neopestalotiopsis* en el suelo de las fincas con plantas que presentan sintomatología.
- Probar diferentes métodos y condiciones de esporulación (temperatura, estrés por UV, fotoperiodo, luz negra, entre otros) para *Neopestalotiopsis* para reducir el tiempo del bioensayo.

- Realizar estudios moleculares de los aislados para obtener la especie de *Neopestalotiopsis* que afecta a las plantaciones de frutillas en Yaruquí.
- Realizar inoculación del patógeno cada semana si la concentración de esporas es baja.

IX. REFERENCIAS

- Agrios , G. (2005). *Plant Pathology*. University of Florida, Plant Pathology. Florida : Elsevier .
- Ameri, A., Tehranifar, A., Shoor, M., & Davarynejad, G. (2012). Study of the Effect of Vermicompost as One of the Substrate Constituents on Yield Indexes of Strawberry. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 4(3), 241-246.
- Ara, T., Monzur, S., Saand, M. A., Islam, R., Alam, S., & Hossain, M. (2017). The first report of Pestalotiopsis sp. causing crown rot disease on strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. *International Journal of Biosciences*, 11(4), 350-358.
- Arcos, C. A., Pinto, D. M., & Páez, J. E. (2007). La cascarilla de arroz como fuente de SiO₂. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*(40), 7-20.
- Ávila Cubillos, E. P. (2015). *Manual de Fresa*. Bogotá: Cámara de Comercio de Bogotá. Obtenido de <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14312/Fresa.pdf?sequence=1>
- Bhagariya, D. A., & Prajapati, V. P. (2019). First Report of Pestalotiopsis clavispora (GF Atk.) Steyaert Causing Crown Rot Disease on Strawberry in India. *International Journal of Economic Plants*, 6(3), 140-142.
- Bonet Gigante , J. (2010). *Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en Fragaria diploide para la mejora del cultivo de fresa*. Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona.
- Calderón Medellín, L. A., Angulo Rivera, D. C., Rodríguez Caicedo, D., Grijalba Rativa, C. M., & Pérez Trujillo, M. M. (2013). Evaluación de Materiales para el Acolchado de la Fresa Cultivada Bajo Invernadero. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 9(1), 8-19.
- Campaña , J. (2019). *Aislamiento, caracterización morfológica y molecular del agente fúngico Neopestalotiopsis saprophytica de la frutilla (Fragaria sp.) en Pichincha-Ecuador*. Tesis de pregrado , Universidad San Francisco de Quito, Quito.

- Cardenas, P. (2018). Análisis del Microbioma de Frutilla Albión en Yaruquí. *Primer Simposio de Suelos y Nutrición de Cultivos* (págs. 65-66). Quito: Archivos Académicos USFQ.
- Castellanos González, L., de Mello Prado, R., & Silva Campos, C. N. (2015). El Silicio en la resistencia de los cultivos. *Cultivos Tropicales*, 36, 16-24.
- Castillo Jumbo, D. S. (2013). *Análisis de la problemática de los pesticidas en el cultivo de frutilla (Fragaria dioica), al norte de la provincia*. Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana, Quito.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos* (Cañedo V. y Ames T. ed.). Lima, Perú.
- Chamorro, M., Aguado, A., & De los Santos, B. (Diciembre de 2015). First Report of Root and Crown Rot Caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on Strawberry in Spain. *Plant Disease*, 100(7), 1495–1495.
- Chávez-Rey, A. C. (19 de Julio de 2019). *Evaluación de recubrimientos naturales y fungicidas para el control postcosecha de mohos en mora (Rubus laciniatus var. Brazos) y Frutilla (Fragaria x ananassa)*. Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito, Politécnico, Quito.
- Curillo Dávila, S. G. (2015). *Análisis de residuos de plaguicidas químicos en alimentos de consumo humano con la metodología de laboratorio ELISA*. Universidad San Francisco de Quito, Quito. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4847/1/121482.pdf>
- Dung, L., Dien, N. T., Dai, P. H., & Tuan, P. N. (2016). The first report of *pestalotiopsis* sp. Causing crown rot disease on strawberries in Dalat. *Dalat university journal of science*, 6(3), 364–376.
- Ecuagroimport. (2017). *Ecuagroimport*. Obtenido de Productos: <http://www.ecuagroimport.com/>
- Essa, T., Kamel, S., Ismail, A., & El-Ganainy, S. (2018). Characterization and Chemical Control of *Neopestalotiopsis rosae* the Causal Agent of Strawberry Root and Crown Rot in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 46(1), 1-19.
- Estrada, G. I., & Ramír, M. C. (2019). *Micología General*. Caldas: Centro Editorial Universidad Católica de Manizales.
- FAOSTAT. (2018, Febrero 11). *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación*. Retrieved Octubre 13, 2018, from Producción de Fresa: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity
- Finn, C. E., Strik, B. C., & Moore, P. P. (2014, April). Strawberry Cultivars for Western Oregon and Washington. *OSU Extension Catalog*, 1-8. Retrieved from <https://catalog.extension.oregonstate.edu/sites/catalog/files/project/pdf/ec1618.pdf>
- Fuller, H., Carothers, Z., Payne, W., & Balbach, M. (1994). *Botánica* (Quinta ed.). México: Interamericana S.A.

- Giampaoli, J., Brandan, C., Enrico, R., Coll, M., & Lencina, V. (Noviembre de 2014). Efecto de la esterilización con métodos físicos en suelo, sobre la flora micorrícica y en el cultivo del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en Horco Molle, Tucumán. *Revista Agronómica del noroeste argentino*, 34(2), 36-39.
- Gobernación Valle del Cauca. (2014). *Programa de manejo fitosanitario en Fresa en el departamento del Valle del Cauca*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Guerra, T., Schilling, S., Hake, K., Gorzolka, K., Sylvester, F.-P., Conrads, B., . . . Romeis, T. (2020). Calcium-dependent protein kinase 5 links calcium signaling with N-hydroxy-L-pipecolic acid-and SARD 1-dependent immune memory in systemic acquired resistance. *New Phytologist*, 225(1), 310-325.
- Guevara-Andrade, J. L. (2015). *Evaluación de la presencia de fusarium oxysporum f. sp. fragariae en el cultivo de frutilla fragaria ananassa duch. mediante indicadores morfológicos, bioquímicos y moleculares en las parroquias de checa, el quinche, pifo, puebo, y yaruquí*. Guaranda: Universidad Estatal de Bolívar.
- Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). (2017). Manual de manejo agronómico de la frutilla. (C. G. Morales, Ed.) *Boletín de difusión*(17), 1-15. Obtenido de <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/17%20Manual%20Frutilla.pdf>
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2017). *Manual de buenas prácticas agrícolas y de producción para el cultivo de la fresa*. San José, Costa Rica : Masterlitho. Obtenido de <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2932/BVE17058869e.pdf;jsessionid=A685720095AC3F5A59CFEDDCD56C818B?sequence=1>
- Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). (2003). *Identificación y manejo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de frutilla*. Montevideo: INIA.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (2015). *Cultivo de Frutas Finas en la Provincia del Neuquén*. Buenos Aires: Imprenta Bavaria. Obtenido de https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/2815/INTA_CRPatagoniaNorte_EEABariloche_Caminiti_A_Cultivo_Frutillas.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Jeewon, R., Liew, E. C., & Hyde, K. D. (2002). Phylogenetic relationships of Pestalotiopsis and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular phylogenetics and evolution*, 25(3), 378-392.
- Juárez, C., Rodríguez, M., Sandoval, M., & Muratalla, A. (Enero-Marzo de 2007). Comparación de tres sistemas de producción de fresa en invernadero. *Terra Latinoamericana*, 25(1), 17-23.
- Llumiquinga Quishpe, P. (2017). *Evaluación de fertilización mineral y órgano/mineral con fertirriego en el cultivo de frutilla Fragaria x ananassa (Weston) Duchesne;*

variedad albión. Tesis pregrado, Universidad Central del Ecuador, Quito.
Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9674/1/T-UCE-0004-17.pdf>

- Machín Barreiro, J. A. (2017). *Identificación de los organismos asociados a la muerte de plantas de frutilla (Fragaria ananassa Duch.) en el departamento de Salto, Uruguay*. Tesis de pregrado, Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo.
- MAG. (2018). *Ministerio de Agricultura y Ganadería*. Obtenido de Datos económicos : <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php>
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50(1), 167-187.
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L.-D., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W. P., Sun, X., . . . Hyde, K. D. (2012). A multi-locus backbone tree for Pestalotiopsis, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, 56(1), 95-129.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). Pestalotiopsis revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121-186.
- Masapanta, J. (2014). *Estudio del mercado de comercialización de la frutilla en la ciudad de salcedo*. Estudio de mercado, Ingeniería en finanzas y auditoría, Quito. Obtenido de <https://es.slideshare.net/Jessyk1994/micro-enviar>
- Mattner, S. W., Porter, I. J., Gounder, R. K., Shanks, A. L., Wren, D. J., & Allen, D. (2008). Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry. *Crop Protection*, 27(8), 1165-1173.
- Medellín, L. A. (2013). Evaluación de materiales para el acolchado de la fresa cultivada bajo invernadero. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 9(1), 8-19.
- Moreira, F., Huising, J., & Bignell, D. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales*. México: Instituto Nacional de Ecología México.
- Nabors, M. (2006). En *Introducción a la botánica* (P. Gonzáles, Trad., págs. 45-49). Madrid: Pearson Educación.
- Núñez, A. (2018). *Análisis microscópico y metagenómico de suelos infestados con la enfermedad de la hoja morada en frutilla (Fragaria sp.) cultivada en Pichincha, Ecuador*. Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito.
- Obregón, V. G., Meneguzzi, N. G., Ibañez, J. M., Lattar, T. E., & Kirschbaum, D. S. (2018). First report of Neopestalotiopsis clavispora causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. *Plant disease*, 102(9), 1856-1856.
- Odey, S. O. (2018). Overview of Engineering Problems of Soil Compaction and Their Effects on Growth and Yields of Crops. *European Journal of Advances in Engineering and Technology*, 5(9), 701-709.

- Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUUDI). (2015). *Cultivo de frutilla, en una realidad sin bromuro de metilo en Chile*. Boletín informativo , Ministerio del Medio Ambiente de Chile , Santiago de Chile.
- Park, K., Han, I., Lee, S. M., Choi, S. L., Kim, M. C., & Lee, H. (2019). Crown and Root Rot of Strawberry Caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 47(4), 427-435.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-Henández, U., Martínez-Ruiz, M., & Parra-Robles, B. E. (2020). An Emerging Strawberry Fungal Disease Associated with Root Rot, Crown Rot and Leaf Spot Caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease*, (ja).
- Rezusta López, A., Sánchez Sousa, A., & Gil Tomás, J. (2007). Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1-22.
- Rodas-Ramón, D. N., & Tituana-Tituana, C. M. (2012). *Estudio de prefactibilidad para la producción y comercialización de fresas en la ciudad de Cuenca*. Previo a la obtención del título de Economista Empresarial , Universidad de Azuay , Cuenca.
- Rostami, Z. E., Ghahsare, A. M., & Kavooosi, B. I. (2014). Date palm waste application as culture media for strawberry and its impact on some growth indices and yield components. *Agricultural Communications*, 2(3), 15-21.
- Sigillo, L., Ruocco, M., Gualtieri, L., Pane, C., & Zaccardelli, M. (2020). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 102(1), 281-281.
- Silva , P., Vergara , W., & Acevedo, E. (2015). *Rotación de cultivos*. Santiago de Chile. Obtenido de <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR40199.pdf>
- Strik, B. C. (Marzo de 2013). Growing Strawberries in Your Home Garden. *OSU Extension catalog*, 1-8. Obtenido de <https://catalog.extension.oregonstate.edu/sites/catalog/files/project/pdf/ec1307.pdf>
- Tapia-Sopalo, G. M. (2015). *Evaluación de tres dosis en dos frecuencias de agrisafe y fludioxonil, para el control de pestalotpia sp. En el cultivo de fresa (fragaria vesca), en el sector el paraíso huachi grande, ambato, tungurahua*. Ambato: Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Valero Gaspar, T., Rodríguez Alonso, P., Ruiz Moreno, E., Ávila Torres, J. M., & Varela Moreiras, G. (2018). Características nutricionales de los principales alimentos . *La alimentación española*(2), 260-261.
- Van Hemelrijck, W., Ceustermans, A., Van Campenhout, J., Lieten, P., & Bylemans, D. (2016). Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. *VIII International Strawberry Symposium*, 1156, págs. 781-786.

- Velázquez, L., Martínez, M., & Romero, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-20). México.
- Venegas-Molina, J., Proietti, S., Pollier, J., Orozco-Freire, W., Ramirez-Villacis, D., & Leon-Reyes, A. (2020). Induced tolerance to abiotic and biotic stresses of broccoli and Arabidopsis after treatment with elicitor molecules. *Scientific Reports*, 10(1), 1-17.
- Verdugo. (2011). *Introducción de dos variedades de fresa (fragaria vesca) y técnica de fertirrigación empleando cuatro biofertilizantes líquidos en Pablo Sexto - Morona Santiago*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Villagrán, V., Legarraga, M., & Zschau, B. (2013). Variedades de frutilla. En INIA, *Manual de frutilla* (págs. 21-29). Chile: Trama Impresores S.A.
- Vizcaino, M. (2011). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de frutilla (Fragaria chiloensis) en Checa*. Universidad San Francisco de Quito, Quito.
- Vu. (2007). *Plant pathology textbook*. Hanoi: Publisher of The University of Agriculture and Forestry I.
- Yáñez, W., & Telenchana Tisalema, J. J. (2018). *Evaluación de sustratos alternativos a base de cascarilla de arroz y compost en plántulas de pimiento (Capsicum annuum L.)*. Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato, Ambato.

X. ANEXOS

A. Análisis estadístico de mortalidad

	Muertas	Vivas	Todo
Suelo + Cascarilla esterilizado	1	11	12
	3,250	8,750	
	-1,2481	0,7606	
Suelo + Cascarilla sin esterili	2	10	12
	3,250	8,750	
	-0,6934	0,4226	
Suelo esterilizado	1	11	12
	3,250	8,750	
	-1,2481	0,7606	
Suelo sin esterilizar	9	3	12
	3,250	8,750	
	3,1895	-1,9439	
Todo	13	35	48

Contenido de la celda
 Conteo
 Conteo esperado
 Residuos estandarizados

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p
Pearson	18,884	3	0,000
Relación de verosimilitud	17,995	3	0,000

B. Análisis estadístico de Diámetro de Corona

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	2,980	0,99337	13,16	0,000
Error	92	6,946	0,07550		
Total	95	9,926			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,274776	30,02%	27,74%	23,81%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
suelo+cascarilla esterilizado	24	1,5477	A
suelo +cascarilla sin esterilizar	24	1,3518	A B
suelo esterilizado	24	1,2831	B
suelo sin esterilizar	24	1,0547	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

C. Análisis estadístico de Área foliar

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	3	10,41	3,47076	65,92	0,000
Error	572	30,12	0,05265		
Total	575	40,53			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,229466	25,69%	25,30%	24,65%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
suelo+cascarilla esterilizado	144	2,7504	A
suelo +cascarilla sin esterilizar	144	2,6716	B
suelo esterilizado	144	2,5969	C
suelo sin esterilizar	144	2,3889	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

D. Análisis estadístico de Número de hojas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	13,37	4,4560	13,92	0,000
Error	92	29,45	0,3201		
Total	95	42,81			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,565738	31,22%	28,98%	25,11%

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
suelo+cascarilla esterilizado	24	2,330	A
suelo +cascarilla sin esterilizar	24	1,8131	B
suelo esterilizado	24	1,7349	B
suelo sin esterilizar	24	1,278	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

E. Análisis estadístico de Medios de cultivo

	Ausencia	Presencia	Todo
Avena	0	7	7
	2,333	4,667	
	-1,528	1,080	
PDA	2	5	7
	2,333	4,667	
	-0,218	0,154	
Sabourad	5	2	7
	2,333	4,667	
	1,746	-1,234	
Todo	7	14	21

Contenido de la celda

Conteo

Conteo esperado

Residuos estandarizados

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p
Pearson	8,143	2	0,017
Relación de verosimilitud	9,982	2	0,007

F. Análisis estadístico de grado de infección en coronas

	0	1	2	3	Todo
Suelo+cascarilla estéril Contr	100	0	0	0	100
	50,251	4,020	37,688	8,040	
	7,018	-2,005	-6,139	-2,836	
Suelo+cascarilla estéril Trata	0	8	75	16	99
	49,749	3,980	37,312	7,960	
	-7,053	2,015	6,170	2,850	
Todo	100	8	75	16	199

Contenido de la celda
 Conteo
 Conteo esperado
 Residuos estandarizados

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p
Pearson	199,000	3	0,000
Relación de verosimilitud	275,868	3	0,000

	0	1	2	3	Todo
Suelo estéril Control	100	0	0	0	100
	50,25	4,02	25,13	20,60	
	7,018	-2,005	-5,013	-4,539	
Suelo estéril Tratamiento	0	8	50	41	99
	49,75	3,98	24,87	20,40	
	-7,053	2,015	5,038	4,562	
Todo	100	8	50	41	199

Contenido de la celda
 Conteo
 Conteo esperado
 Residuos estandarizados

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p			
Pearson	199,000	3	0,000			
Relación de verosimilitud	275,868	3	0,000			
	0	1	2	3	Todo	
Suelo+cascarilla no estéril Con	0	33	66	0	99	
		24,50	74,50			
		1,7173	-0,9848			
Suelo+cascarilla no estéril Tra	0	16	83	0	99	
		24,50	74,50			
		-1,7173	0,9848			
Todo	0	49	149	0	198	
<i>Contenido de la celda</i>						
<i>Conteo</i>						
<i>Conteo esperado</i>						
<i>Residuos estandarizados</i>						

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p			
Pearson	7,838	1	0,005			
Relación de verosimilitud	7,966	1	0,005			
	0	1	2	3	Todo	
Suelo no estéril Control	0	33	66	0	99	
		36,32	42,78	19,90		
		-0,550	3,549	-4,461		
Suelo no estéril Tratamiento	0	40	20	40	100	
		36,68	43,22	20,10		
		0,548	-3,532	4,439		
Todo	0	73	86	40	199	
<i>Contenido de la celda</i>						
<i>Conteo</i>						
<i>Conteo esperado</i>						
<i>Residuos estandarizados</i>						

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p
Pearson	65,273	2	0,000
Relación de verosimilitud	82,056	2	0,000

Filas: Bioensayo Columnas: Valor

	0	1	2	3	Todo
Suelo estéril Control	100	0	0	0	100
	50,25	16,58	33,17		
	7,018	-4,072	-5,759		
Suelo no estéril Control	0	33	66	0	99
	49,75	16,42	32,83		
	-7,053	4,093	5,788		
Suelo+cascarilla estéril Contr	100	0	0	0	100
	50,25	16,58	33,17		
	7,018	-4,072	-5,759		
Suelo+cascarilla no estéril Con	0	33	66	0	99
	49,75	16,42	32,83		
	-7,053	4,093	5,788		
Todo	200	66	132	0	398

Contenido de la celda
 Conteo
 Conteo esperado
 Residuos estandarizados

Prueba de chi-cuadrada

	Chi-cuadrada	GL	Valor p
Pearson	398,000	6	0,000
Relación de verosimilitud	551,735	6	0,000