

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación

**Evaluación del efecto de fungicidas para el control de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. en hojas de cinco variedades de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de laboratorio**

Estudiante

Adrián José Pacheco Vega

Asesores

Carolina Avellaneda Ph. D.

Rogelio Trabanino M. Sc.

Honduras, Julio 2022

**Autoridades**

**TANYA MÜLLER GARCÍA**

Rectora

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

## Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Anexos.....	6
Resumen .....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos.....	12
Ubicación .....	12
Preparación de Medio para Establecimiento de los Hongos.....	12
Fase 1 - Elaboración de Protocolo para Inoculación de <i>Botrytis</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. en Hojas de Cinco Híbridos de Tomate bajo Condiciones de Laboratorio .....	12
Preparación de Medio para Siembra de Hojas .....	12
Colecta de hojas.....	13
Lavado y Desinfección de Hojas.....	13
Siembra de Hojas e Inoculación de Hongos.....	13
Evaluación del Crecimiento de Micelio sobre las Hojas.....	13
Fase 2- Elaboración de Protocolo para la Inoculación de <i>Botrytis</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. ante la Presencia de Tres Concentraciones de Fungicidas.....	13
Distribución de los Fungicidas a Diferentes Concentraciones en el Medio Agar Papa Dextrosa .....	13
Dilución de Fungicidas .....	15
Inoculación de Hongos.....	15

Evaluación de la Efectividad de los Fungicidas para Inhibir el Crecimiento de Hongos .....	15
Diseño Experimental y Análisis Estadístico .....	16
Resultados y Discusión.....	17
Fase 1 - Crecimiento de <i>Botrytis</i> spp. en Variedades de Tomate .....	17
Análisis del Crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. en Variedades de Tomate .....	17
Fase 2-Análisis del crecimiento de <i>Botrytis</i> spp. ante Fungicidas.....	18
Análisis del Crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. ante Fungicidas .....	19
Conclusiones .....	21
Recomendaciones.....	22
Referencias.....	23
Anexos.....	25

### Índice de Cuadros

Cuadro 1. Fungicidas con sus Dosis Comerciales .....	15
Cuadro 2. Dilución y Dosificación de Fungicidas .....	15
Cuadro 3. Crecimiento Micelar de <i>Botrytis spp.</i> sobre Hojas de las Variedades de Tomate .....	17
Cuadro 4. Crecimiento Micelar de <i>Fusarium spp.</i> sobre Hojas de las Variedades de Tomate .....	18
Cuadro 5. Efecto de Fungicidas a Concentraciones de 100, 90 y 80% en el Crecimiento Micelar de <i>Botrytis spp.</i> .....	19
Cuadro 6. Efecto de Fungicidas a Concentraciones de 100, 90 y 80% en el Crecimiento Micelar de <i>Fusarium spp.</i> .....	20

### Índice de Anexos

Anexo A. Protocolo para la elaboración de agar papa dextrosa (PDA) solido para la inoculación in vitro.....	25
Anexo B. Protocolo para la inoculación de hongos.....	26
Anexo C. Protocolo para la elaboración de agar agua semisólido para inoculación de hojas de variedades del tomate (AA). .....	27
Anexo D. Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico. ....	28
Anexo E. Identificación de <i>Botrytis</i> spp.....	29
Anexo F. Identificación <i>Fusarium</i> spp. ....	30

## Resumen

El Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más importantes de América Latina, la producción de esta hortaliza se ha visto reducido por diferentes plagas y enfermedades. En este estudio, se evaluó el diámetro de crecimiento micelar de los hongos, en medio de cultivo con presencia de los fungicidas (Sulfato de cobre pentahidratado y oxitetraciclina; *Bacillus subtilis*; Dietilditiocarbamato y *Reynoutria sachalinensis*), a concentraciones de 100, 90 y 80 % de la recomendación del fabricante sobre las variedades (AVTO2120; AVTO2128; AVTO1908; AVTO2123 y AVTO1954) del World Vegetable Center. Se usó un diseño completamente al azar, con 180 unidades experimentales en la primera fase de evaluación del crecimiento de los hongos sobre las variedades y 96 unidades experimentales en la evaluación de concentraciones de los fungicidas. El crecimiento de *Botrytis* spp., en la variedad AVTO1908 al noveno día de haber inoculado el hongo, obtuvo un menor crecimiento micelar con una media 1.75 cm con Dietilditiocarbamato al 80% de su concentración comercial, inhibe el crecimiento de *Botrytis* spp. Al mismo tiempo, la variedad AVTO2123 en el medio con sulfato de cobre pentahidratado y oxitetraciclina al 90 % de su concentración comercial se observó crecimiento de 1.73 cm inhibiendo el crecimiento de *Fusarium* spp., obteniendo mejores resultados en prevenir el crecimiento de estos dos hongos.

*Palabras clave:* *Botrytis* spp., fungicida, *Fusarium* spp., *in vitro*, inhibición, variedad

### Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important crops in Latin America, the production of this vegetable has been reduced by different pests and diseases. In this study, the mycelial growth diameter of fungi was evaluated in culture medium with the presence of fungicides (copper sulfate pentahydrate and oxytetracycline; *Bacillus subtilis*; diethyldithiocarbamate and *Reynoutria sachalinensis*), at concentrations of 100, 90 and 80 % of the manufacturer's recommendation on the varieties (AVTO2120; AVTO2128; AVTO1908; AVTO2123 and AVTO1954) of the World Vegetable Center. A completely randomized design was used, with 180 experimental units in the first phase of evaluation of fungal growth on the varieties and 96 experimental units in the evaluation of fungicide concentrations. The growth of *Botrytis* spp, the growth of *Botrytis* spp. in the variety AVTO1908 on the ninth day after inoculation of the fungus, obtained a lower micellar growth with an average of 1.75 cm with Diethyldithiocarbamate at 80% of its commercial concentration, inhibits the growth of *Botrytis* spp. At the same time, the variety AVTO2123 in the medium with copper sulfate pentahydrate and oxytetracycline at 90% of its commercial concentration was observed growth of 1.73 cm, inhibiting the growth of *Fusarium* spp, obtaining better results in preventing the growth of these two fungi.

*Key words:* *Botrytis* spp., fungicide, *Fusarium* spp., in vitro, inhibition, variety

## Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza de la familia solanácea que incluyen a más de 3.000 especies, muchas de ellas con importancia económica (Knapp 2002). Según la evidencia genómica encontrada por Razifard et al. (2020) se reconoce que el tomate se originó en la región Andina de Sudamérica, específicamente en Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú.

Este cultivo es una de las hortalizas más importantes a nivel global, teniendo un incremento anual de la superficie cosechada de 1.4% en promedio entre 2003 y 2013 con un crecimiento en el rendimiento promedio de 1.8% anual. En la actualidad, los países que tienen la mayor producción de tomates en América Latina son: México, Brasil y Colombia (Statista Research Department 2021).

En Centro América, el tomate es la hortaliza de mayor consumo e investigación en los centros de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades tolerantes a enfermedades y plagas. El rendimiento promedio de tomate en Honduras es de 31,6 t , superado por Guatemala con 38,5 t y México con 43,3 t (Organizacion de las Naciones Unidad para la Alimentacion y la Agricultura 2022), siendo una de las hortalizas que presenta mayor retorno económico.

Dicha hortaliza al ser cultivada en el trópico esta propensa a contraer enfermedades como *Botrytis* spp. o comúnmente llamado moho gris, siendo una especie de hongo saprofito. Este hongo actúa deteriorando a la planta que infecta, debido a que produce en la planta la muerte prematura de las células, por la segregación de enzimas y toxinas (Fillinger y Elad 2016).

De acuerdo con Elad et al. (2004) en los últimos años *Botrytis* spp. se ha convertido en un organismo modelo de investigación, donde se ha iniciado estudios de mecanismos generales en las interacciones planta-patógeno. Este hongo ha sido considerado por muchos expertos del área, como el segundo hongo más importante del mundo en cuanto a los efectos económicos y sociales, afectando a más de 1400 especies de cultivares en el mundo, siendo de gran importancia para la población mundial. Además para Bretthauer et al. (2022), este hongo ha provocado pérdidas significativas de cosechas alrededor del mundo, a causa de su gran adaptabilidad a los fungicidas, de

hecho, ha sido necesario el aumento continuo de las dosificaciones, conllevando a serios problemas de persistencia en los suelo, vegetales y frutos, incluso después de la recolección de las cosechas. La presencia de *Botrytis* spp., la podemos observar en la naturaleza o en los cultivos, presentándose como un micelio de color gris o grisáceo lo cual produce síntomas como: manchas y podredumbre (Martínez Oyuela y Moreno Castañeda 2008).

El método principal de dispersión es mediante esporas asexuales que son movilizadas por el viento, una vez que las esporas entran en contacto con el hospedero vegetal las primeras 24 horas producen adhesión, germinación y penetración al tubo germinal a través del tejido vegetal procediendo a formar una lesión primaria, después procederá a tener un desarrollo rápido de crecimiento y expansión de la lesión necrótica (FHIA 2017).

Asimismo, otra enfermedad que ataca al tomate es *Fusarium* spp. o comúnmente llamado podredumbre de las raíces, mencionado hongo provoca pérdidas entre 26 y 47 % en los rendimientos productivos. Por otra parte, *Fusarium* spp. se subdivide en formas especiales de acuerdo con el huésped al que infectan y no según sus diferencias taxonómicas (Rodríguez 2019).

Su amplia distribución se atribuye a su capacidad para crecer en gran número de substratos y a su eficaz mecanismo de dispersión, donde el aire y la lluvia han demostrado que pueden llevar las esporas hasta 400 km de distancia (Monzón y Rodríguez 2010). Este hongo empieza a entra en la planta a través de las raíces y a su vez coloniza el sistema vascular del xilema bloqueando el flujo de agua y nutrientes, la progresión de la enfermedad resulta en el colapso de las hojas en el peciolo, la rajadura de la base del pseudotronco y eventualmente la muerte de la planta. No obstante, el hongo *Fusarium* spp. provoca síntomas de amarillamiento en hojas y en los tallos pierde turgencia, colapsando cultivos de cucurbitáceas y solanáceas (tomate, pimiento y chiles picantes) (Michielse y Rep 2009).

Según Namesny Vallespir (2000) uno de los mejores métodos para el control de este tipo de enfermedades es la prevención, ya que ningún método de control logra eliminar la enfermedad una

vez establecida. El uso de variedades resistentes a las diferentes razas de los hongos es una de las mejores opciones si estas son accesibles. También la desinfección de suelos mediante solarización o el uso de productos químicos que reduzcan en gran medida los daños causados, finalizando con la aplicación de pasteurización en los sustratos y la rotación prolongada de cultivos que dure más de cinco años reduciendo notablemente los daños patogénicos.

El proceso para el control de enfermedades en las plantas se clasifica de acuerdo con la causa y desarrollo, por lo que su control se podría realizar con un solo procedimiento, aunque la mayoría de los casos exige la utilización de medidas múltiples, aplicando un programa integrado de manipulación de ambiente, factores reglamentarios, culturales, biológicos, físicos y químicos. Teniendo en cuenta los antecedentes se estableció como objetivo, la evaluación de cuatro fungicidas a concentraciones de 100, 90 y 80% para inhibir el crecimiento de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. en híbridos de tomate bajo condiciones de laboratorio.

## **Materiales y Métodos**

### **Ubicación**

El estudio se realizó en el laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. Dividiendo en dos fases a nivel de laboratorio: la primera fase, fue observar el crecimiento de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. sobre las hojas de cinco híbridos de tomate en medios de cultivo agar agua. El material vegetal a evaluar procedía de unos de los lotes de producción de hortalizas ubicado en Zona tres, Zamorano. En la segunda fase, se evaluó el crecimiento de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. con la aplicación de tres diferentes concentraciones de fungicidas en medios agar papa dextrosa.

### **Preparación de Medio para Establecimiento de los Hongos**

La utilización de agar papa dextrosa (PDA) por su alta disponibilidad de almidones, brinda condiciones favorables para el crecimiento y esporulación de hongos, Anexo A. El medio fue expuesto a una temperatura de 121° C durante 45 minutos con una presión de 1.0546 Kg/cm<sup>2</sup> para ser esterilizados y vertidos en platos Petri. Consecuentemente después de que se haya solidificado el medio, se procedió a inocular *Botrytis* spp. de las fresas comerciales que se dejaron dentro de la refrigeradora durante 1 mes y *Fusarium* spp. del banco fúngico del laboratorio de fitopatología para su crecimiento, siendo estos a continuación utilizados en las diferentes fases.

### **Fase 1 - Elaboración de Protocolo para Inoculación de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. en Hojas de Cinco Híbridos de Tomate bajo Condiciones de Laboratorio**

#### ***Preparación de Medio para Siembra de Hojas***

Se elaboró un medio agar agua (AA) semisólido, usando una relación de 4 g de bacto-agar por litro de agua destilada, Anexo C. Siendo un soporte y ayuda para las hojas, al conservar temporalmente su turgencia (Manual del laboratorio de Fitopatología, 2022).

### ***Colecta de Hojas***

Con la selección de los híbridos: AVTO2120, AVTO2128, AVTO1908, AVTO2123 y AVTO1954 se cortaron 36 hojas por variedad para dos diferentes hongos, considerando la ausencia de lesiones, contaminantes, enfermedades o plagas. Las hojas fueron trasladadas al Laboratorio de Fitopatología en condiciones asépticas.

### ***Lavado y Desinfección de Hojas***

La desinfección de hojas se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, utilizando una solución con cloro al 3% y agua filtrada estéril, donde la hoja permaneció por tres minutos. Luego se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril, sumergiéndolas durante dos minutos por enjuague, consecuentemente se le seco usando papel filtro estéril, para así establecerlos después en el medio.

### ***Siembra de Hojas e Inoculación de Hongos***

Dentro de la cámara de flujo laminar, se utilizó una pinza estéril para sembrar todas las hojas frescas desinfectadas de las cinco variedades, asegurando que el envés, quede en contacto con el medio de cultivo, Anexo D. Así mismo, con ayuda de un bisturí estéril se inoculó, los hongos anteriormente aislados en agar papa dextrosa, al colocar trozos de 5 milímetros cuadrados de agar con los hongos sobre el haz de todas las hojas.

### ***Evaluación del Crecimiento de Micelio sobre las Hojas***

Al tener inoculadas las hojas con *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp., se realizó la medición del crecimiento de micelio en centímetros con una regla durante los 3, 6 y 9 días después de haber sido inoculados. Determinando de manera cuantitativa el crecimiento micelar sobre las variedades y observando si las variedades son tolerantes.

## **Fase 2- Elaboración de Protocolo para la Inoculación de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. ante la Presencia de Tres Concentraciones de Fungicidas**

### ***Distribución de los Fungicidas a Diferentes Concentraciones en el Medio Agar Papa Dextrosa***

Se evaluaron cuatro fungicidas para el control de ambas enfermedades, siendo:

Sulfato de Cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina cuyo modo de acción es la desnaturalización inespecífica de las proteínas celulares cuando las esporas fúngicas germinantes absorben iones tóxicos de cobre (Husak 2020).

*Bacillus subtilis* es un fungicida que previene el ataque de patógenos, evitando la formación del tubo germinativo y el micelio del hongo, evitando así su colonización. Además, detiene la germinación de esporas brindando un efecto protectante a la planta. La formulación del fungicida posee lipopéptidos que sinérgicamente actúan sobre la membrana celular provocando la muerte del patógeno (Agro Bayer Centroamérica 2020).

Dietilditiocarbamato, Ordóñez C et al. (2002) lo describen como un polímero complejo de etilen bis (diocarbamato) de magnesio y zinc utilizado como protectivo. Mencionado fungicida actúa preventivamente, alterando funciones de la membrana celular, inhibiendo la respiración de los hongos (Álvarez 2020).

*Reynoutria sachalinensis*, su modo de acción es la inducción del sistema inmune de la planta, ayuda a la producción de fitoalexinas, compuestos fenólicos, antioxidantes y proteínas. También inhibe la germinación de esporas, actúa induciendo la producción de ácido ferúlico el cual ayuda a la lignificación de la pared celular generando una mayor resistencia ante la penetración de los patógenos (FARMAGRO S.A 2019; Reyes 2019).

Estos cuatro fungicidas anteriormente descritos, se mezclaron con 200 mL de medio agar papa dextrosa (PDA), dividió en concentraciones de 100, 90 y 80% para cada fungicida. El contenido de cada concentración se muestra en el Cuadro 1, posteriormente se realizó la inoculación de los hongos, utilizando el protocolo del laboratorio, Anexo B.

**Cuadro 1***Fungicidas con sus Dosis Comerciales*

Nombre comercial	Ingrediente activo	Unidad	Dosis comercial/ha
Tacre P-Cur-Nir 32SC	Sulfato de cobre Pentahidratado (27), Oxitetraciclina (5)	L	0.5
Serenade® 1.36SC	<i>Bacillus subtilis</i>	L	2
Mancozeb 80WP	Dietilditiocarbamato	Kg	1.5
Regalia Maxx® 20EC	<i>Reynoutria sachalinensis</i> 20%	L	1.25

Nota. WP= polvo mojable, SC= líquido soluble, EC= concentrado emulsionable

**Dilución de Fungicidas**

Se evaluaron tres concentraciones para cada fungicida, partiendo de la dosis comercial mínima, Cuadro 1. En el Cuadro 2, se especifica la dosificación utilizada.

**Cuadro 2***Dilución y Dosificación de Fungicidas*

Nombre comercial	Unidad	Dosis comercial/200 mL PDA	Dosis comercial al 90% /200 mL PDA	Dosis comercial al 80%/200 mL PDA
Dietilditiocarbamato	g	0.400	0.360	0.320
Sulfato de cobre pentahidratado	mL	0.500	0.453	0.400
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	mL	0.300	0.260	0.224
<i>Bacillus subtilis</i>	mL	2	1.8	1.6

**Inoculación de Hongos**

Al tener los medios con las tres concentraciones para cada fungicida, se procedió a utilizar un bisturí estéril para cortar trozos de 5 milímetros cuadrados de *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. anteriormente establecidos. En la realización del corte se procuró escoger esporas jóvenes de los dos hongos, para después en la inoculación hagan contacto con los diferentes medios. Anexo B.

**Evaluación de la Efectividad de los Fungicidas para Inhibir el Crecimiento de Hongos**

Al tener inoculados los medios con *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp., se realizó la medición del crecimiento de micelio, en centímetros, ante la presencia de cuatro fungicidas con tres concentraciones durante los 3, 6 y 9 días después de haber sido inoculados.

### **Diseño Experimental y Análisis Estadístico**

Se usó un diseño experimental completamente al azar, en la primera fase se realizó 5 tratamientos siendo las variedades AVTO 2120, 2128, 1908, 2123 y 1954 ante el crecimiento de *Botrytis* spp. y de igual modo las mismas variedades ante el crecimiento de *Fusarium* spp, obteniendo 10 tratamientos. Se realizaron 18 repeticiones por tratamiento. La segunda fase, se realizó con 3 tratamientos siendo las concentraciones de 100, 90 y 80% para Dietilditiocarbamato, Sulfato de Cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina, *Bacillus subtilis* y *Reynoutria sachalinensis* ante el crecimiento de *Botrytis* spp. y de igual modo las 3 concentraciones de los mismos fungicidas ante el crecimiento de *Fusarium* spp. obteniendo 24 tratamientos (tres concentraciones, 4 fungicidas, 2 patógenos) con 4 repeticiones. Se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) con comparación de medias Duncan con una probabilidad  $P \leq 0.05$ , recurriendo al uso del programa estadístico InfoStat para el análisis de dichos datos.

## Resultados y Discusión

### Fase 1 - Crecimiento de *Botrytis* spp. en Variedades de Tomate

Al día nueve las variedades AVTO 2120, 1908 y 1954 fueron las que mayor tolerancia tuvieron ante el crecimiento de *Botrytis* spp., al tener las menores medias de crecimiento micelar, entendiendo que tendrán el mismo nivel de tolerancia. Por otra parte, las variedades AVTO2123 y AVTO2128 fueron susceptibles ante *Botrytis* spp. al tener crecimientos micelares mayores, provocando así un mayor daño las variedades de Tomate. Cuadro 3.

### Cuadro 3

*Crecimiento Micelar de Botrytis spp. sobre Hojas de las Variedades de Tomate*

Híbridos	Diámetro de micelio (cm)		
	3 Día	6 Día	9 Día
AVTO2120	1.03 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>	4.46 <sup>a</sup>
AVTO1954	1.04 <sup>a</sup>	2.94 <sup>bc</sup>	5.12 <sup>ab</sup>
AVTO2123	1.11 <sup>a</sup>	3.60 <sup>c</sup>	5.44 <sup>b</sup>
AVTO1908	1.14 <sup>a</sup>	2.65 <sup>b</sup>	4.42 <sup>a</sup>
AVTO2128	1.50 <sup>b</sup>	2.58 <sup>b</sup>	5.37 <sup>b</sup>
Probabilidad	<0.0001	0.0001	0.0413
R <sup>2</sup>	0.37	0.24	0.11
CV	19.80	48.61	26.00

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

### Análisis del Crecimiento de *Fusarium* spp. en Variedades de Tomate

Al día nueve las variedades AVTO 2120, 1908 y 2128 fueron las que mayor tolerancia tuvieron ante el crecimiento de *Fusarium* spp., al tener las menores medias de crecimiento micelar, entendiendo que tendrán el mismo nivel de tolerancia. Por otra parte, las variedades AVTO2123 y AVTO1954 fueron susceptibles ante *Fusarium* spp. al tener crecimientos micelares mayores, provocando así un mayor daño las variedades de Tomate. Cuadro 4.

**Cuadro 4***Crecimiento Micelar de Fusarium spp. sobre Hojas de las Variedades de Tomate*

Híbridos	Diámetro de micelio (cm)		
	3 Día	6 Día	9 Día
AVTO2120	1.51 <sup>a</sup>	2.78 <sup>a</sup>	5.27 <sup>a</sup>
AVTO1954	1.99 <sup>c</sup>	3.56 <sup>ab</sup>	6.06 <sup>b</sup>
AVTO2123	1.86 <sup>bc</sup>	4.90 <sup>c</sup>	6.63 <sup>b</sup>
AVTO1908	1.76 <sup>abc</sup>	3.93 <sup>b</sup>	5.94 <sup>ab</sup>
AVTO2128	1.61 <sup>ab</sup>	3.31 <sup>ab</sup>	5.89 <sup>ab</sup>
Probabilidad	0.0133	<0.0001	0.0060
R <sup>2</sup>	0.14	0.28	0.15
CV	25.46	31.30	17.58

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

**Fase 2-Análisis del crecimiento de *Botrytis* spp. ante Fungicidas**

El ingrediente Reynoutria sachalinensis con las concentraciones de 80 y 90% inhibe el crecimiento de *Botrytis* spp. en 77,32% y 79,33% respectivamente, estos dos tratamientos tienen menor efecto al prevenir *Botrytis* spp., además de ser estos dos estadísticamente menores en comparación con el resto de los tratamientos. Por el contrario, Dietilditiocarbamato al 80% inhibe en un 89,20% el crecimiento de *Botrytis* spp. al realizar la comparación con el control, determinando que fue el tratamiento que mayor efecto tuvo en prevenir *Botrytis* spp., debido a tener la menor media de crecimiento micelar ante el resto de las concentraciones. Los tratamientos de Dietilditiocarbamato concuerdan con los estudios de Martínez Oyuela y Moreno Castañeda (2008), donde al realizar su investigación encontraron que al usar el ingrediente activo Dietilditiocarbamato, produce un efecto positivo al prevenir el crecimiento de *Botrytis* spp. sobre las rosas, sin embargo, hallaron que al comparar el grado de severidad en los pétalos de rosas tiene importancia al momento de seleccionar un producto para prevenir el crecimiento de *Botrytis* spp. Cuadro 5.

**Cuadro 5**

*Efecto de Fungicidas a Concentraciones de 100, 90 y 80% en el Crecimiento Micelar de Botrytis spp.*

Tratamientos	Concentraciones	Diámetro de micelio (cm)		
		Día 3	Día 6	Día 9
Sulfato de Cobre	100%	1.43 <sup>ab</sup>	1.78 <sup>a</sup>	2.20 <sup>a</sup>
Pentahidratado y Oxitetraciclina	90%	1.60 <sup>abcd</sup>	2.20 <sup>ab</sup>	2.40 <sup>a</sup>
	80%	1.38 <sup>ab</sup>	1.65 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	1.38 <sup>ab</sup>	1.75 <sup>a</sup>	2.18 <sup>a</sup>
	90%	1.60 <sup>abcd</sup>	2.15 <sup>ab</sup>	2.58 <sup>ab</sup>
	80%	1.65 <sup>abcd</sup>	1.95 <sup>a</sup>	2.23 <sup>a</sup>
Dietilditiocarbamato	100%	1.55 <sup>abc</sup>	1.93 <sup>a</sup>	1.98 <sup>a</sup>
	90%	1.15 <sup>a</sup>	1.70 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>
	80%	1.28 <sup>ab</sup>	1.53 <sup>a</sup>	1.75 <sup>a</sup>
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	1.48 <sup>abc</sup>	2.05 <sup>ab</sup>	2.33 <sup>a</sup>
	90%	1.68 <sup>bcd</sup>	2.80 <sup>bc</sup>	3.35 <sup>bc</sup>
	80%	1.98 <sup>cd</sup>	3.20 <sup>c</sup>	3.68 <sup>c</sup>
Control	0%	2.70 <sup>e</sup>	4.33 <sup>e</sup>	5.38 <sup>d</sup>
Probabilidad		0.0204	0.0262	0.0126
R <sup>2</sup>		0.77	0.81	0.83
CV		17.57	20.68	20.98

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

**Análisis del Crecimiento de *Fusarium* spp. ante Fungicidas**

El ingrediente *Reynoutria sachalinensis* al 100% prevé el crecimiento de *Fusarium* spp. en un 66,11% respectivamente al compararlo con el control, siendo la concentración menos efectiva al momento de prevenir el crecimiento de este hongo, sin embargo, estadísticamente es similar a las concentraciones de *Reynoutria sachalinensis* 90% y 80%. Por otra parte, Sulfato de Cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina al 90% prevé en un 87.22% el crecimiento de *Fusarium* spp., siendo así el tratamiento que mayor efecto tuvo, debido a tener la menor media de crecimiento micelar que los demás tratamientos. Los tratamiento con Sulfato de Cobre Pentahidratado Y Oxitetraciclina concuerdan con Alburqueque Andrade (2018), donde sus resultados presentaron una disminución en el micelio de *Fusarium* in vitro. Por lo contrario, Ihsan y Jawhary (2006) demostraron que en sus

tratamientos con Sulfato de Cobre Pentahidratado tienen diferentes efectos sobre los micelios de distintas especies de *Fusarium*. Cuadro 6.

### Cuadro 6

*Efecto de Fungicidas a Concentraciones de 100, 90 y 80% en el Crecimiento Micelar de Fusarium spp*

Tratamientos	Concentraciones	Diámetro de micelio (cm)		
		Día 3	Día 6	Día 9
Sulfato de cobre	100%	1.25 <sup>ab</sup>	1.65 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>
Pentahidratado y	90%	1.05 <sup>a</sup>	1.28 <sup>a</sup>	1.73 <sup>a</sup>
Oxitetraciclina	80%	1.33 <sup>ab</sup>	1.55 <sup>a</sup>	1.88 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	100%	1.40 <sup>ab</sup>	1.80 <sup>a</sup>	2.33 <sup>ab</sup>
	90%	1.53 <sup>abc</sup>	2.00 <sup>a</sup>	2.60 <sup>abc</sup>
	80%	1.28 <sup>ab</sup>	1.75 <sup>a</sup>	2.25 <sup>a</sup>
Dietilditiocarbamato	100%	1.58 <sup>abc</sup>	1.83 <sup>a</sup>	2.20 <sup>a</sup>
	90%	1.55 <sup>abc</sup>	1.90 <sup>a</sup>	2.48 <sup>abc</sup>
	80%	1.60 <sup>abc</sup>	1.90 <sup>a</sup>	2.13 <sup>a</sup>
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	100%	1.53 <sup>abc</sup>	2.95 <sup>b</sup>	4.58 <sup>f</sup>
	90%	1.80 <sup>bc</sup>	2.93 <sup>b</sup>	4.48 <sup>def</sup>
	80%	1.68 <sup>bc</sup>	2.95 <sup>b</sup>	4.40 <sup>ef</sup>
Control	0%	2.73 <sup>e</sup>	4.78 <sup>c</sup>	6.53 <sup>g</sup>
Probabilidad		0.1787	0.0003	<0.0001
R <sup>2</sup>		0.69	0.74	0.85
CV		19.93	23.96	20.33

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

### Conclusiones

El Dietilditiocarbamato al 80 % de su concentración comercial mostró un mayor efecto en inhibir *Botrytis* spp. obteniendo una media de crecimiento menor comparado con los demás productos evaluados, siendo el AVTO1908 el más tolerante a *Botrytis* spp. El Sulfato de Cobre Pentahidratado y Oxitetraciclina al 90% de su concentración inhibió a *Fusarium* spp. y el AVTO2123 fue el que mostró mayor tolerancia a *Fusarium* spp. observándose una menor media de crecimiento del micelio.

### Recomendaciones

Realizar evaluaciones de Dietilditiocarbamato en las variedades más susceptibles a *Botrytis* spp., además de, también evaluar Sulfato de cobre pentahidratado en las variedades más susceptibles a *Fusarium* spp.

Evaluar Dietilditiocarbamato y Sulfato de cobre pentahidratado ante la presencia de los mismos hongos en diferentes cultivos.

Evaluar Dietilditiocarbamato y Sulfato de cobre pentahidratado ante la presencia de otras enfermedades causadas por hongos.

Comparar Dietilditiocarbamato, Sulfato de cobre pentahidratado y un extracto natural, para determinar cual tendrá mayor efecto en inhibir a *Botrytis* spp. o *Fusarium* spp.

## Referencias

- Agro Bayer Centroamérica. 2020. Fungicida Serenade. Costa Rica: Bayer; [actualizado el 15 de jun. de 2022; consultado el 15 de jun. de 2022]. 2 p. <https://agro.bayer-ca.com/productos/serenade-134-sccr>.
- Alburqueque Andrade D. 2018. Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*; [consultado el 15 de jun. de 2022]. 25(2). doi:10.22497/arnaldoa.252.25209.
- Álvarez M. 2020. Ft-Mancozeb-430-SC-DVA. DVA DE COLOMBIA LTDA; [consultado el 16 de jun. de 2022]. 2:1–3. <https://dva.com.co/wp-content/uploads/2020/01/FT-MANCOZEB-430-SC-DVA.pdf>.
- Bretthauer S, Nixon P, Mauric O, Paulsrud B, Refsell D, Schuster J, Weinzierl R, Wiesbrook M. 2022. *Gray Mold (Botrytis)*. USA: University of Illinois at Urbana-Champaign; [actualizado el 2 de jun. de 2022; consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://web.extension.illinois.edu/focus/index.cfm?problem=gray-mold-ibotrytisi>.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, editores. 2004. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers. 428 p. ISBN: 978-1-4020-2626-3.
- Espinosa de los Monteros MC. oct. 2006. Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea* [Trabajo de Doctorado]. España: Universidad de Cádiz. 223 p; [consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/15678/MCarbuEspinosa.pdf?sequence=1>.
- FARMAGRO S.A. 2019. Regalia Maxx - Extracto de *Reynoutria sachalinensis*. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 16 de jun. de 2022; consultado el 16 de jun. de 2022]. <http://www.farmagro.com.pe/p/regalia-maxx/>.
- [FHIA] Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. 2017. Programa de Hortalizas. Centro de Comunicación Agrícola de la FHIA. La Lima: [sin editorial]. 110 p. (vol. 1); [consultado el 2 de jun. de 2022]. [http://www.fhia.org.hn/descargas/informes\\_tecnicos/inf\\_Programa\\_de\\_Hortalizas-2017.pdf](http://www.fhia.org.hn/descargas/informes_tecnicos/inf_Programa_de_Hortalizas-2017.pdf).
- Fillinger S, Elad Y. 2016. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Cham: Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-23370-3; [consultado el 14 de jun. de 2022].
- Husak V. 2020. Copper and Copper-Containing Pesticides: Metabolism, Toxicity and Oxidative Stress. *jpnu*; [consultado el 15 de jun. de 2022]. 2(1):38–50. doi:10.15330/jpnu.2.1.38-50.
- Ihsan FH, Jawhary AL. 2006. Effect of copper sulfate on some soil fungi isolated from AL-Qadisiya District fields. *Irak: AL-Qadisiya*. 9 p; [consultado el 15 de jun. de 2022]. [https://www.mosuljournals.com/article\\_129064\\_f73e0bf44dd4f29edd4066c05d8a36ff.pdf](https://www.mosuljournals.com/article_129064_f73e0bf44dd4f29edd4066c05d8a36ff.pdf).
- Knapp S. 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J Exp Bot*. 53(377):2001–2022. eng. doi:10.1093/jxb/erf068.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1ª ed. USA: Wiley. 387 p. ISBN: 9780813819198; [consultado el 3 de jun. de 2022].

- Martínez Oyuela MDLA, Moreno Castañeda ZY. feb. 2008. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PPC) preventivos para el control de *Botrytis* sp, en condiciones semicontroladas [Trabajo de grado]. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana; [consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8532/tesis104.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Michielse CB, Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*. 10(3):311–324. eng. doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x.
- Monzón A, Rodríguez J. 2010. Infecciones causadas por el género *Fusarium*. *Control Calidad SEIMC*; [consultado el 2 de jun. de 2022]. (3):1–6. <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>.
- Namesny Vallespir A. 2000. Control de hongos y otros patógenos. *Revista Agro Económico*; [consultado el 2 de jun. de 2022]. 1. <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/64043-Control-de-hongos-y-otros-patogenos.html>.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev*; [consultado el 3 de jun. de 2022]. 7(4):479–504. eng. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358338/>. doi:10.1128/cmr.7.4.479.
- Ordóñez C, Bayoumi A, Pérez Pertejo Y, Balaña Fouce R, Ordóñez D. 2002. Citotoxicidad del fungicida mancozeb en cultivos de CHO-K1. *Revista de Toxicología*. 19(1):29–34. Español. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91919103>.
- Organizacion de las Naciones Unidad para la Alimentacion y la Agricultura. 2022. FAOSTAT. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 25 de may. de 2022; consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://www.fao.org/faostat/es/>.
- Razifard H, Ramos A, Della Valle AL, Bodary C, Goetz E, Manser EJ, Li X, Zhang L, Visa S, Tieman D, et al. 2020. Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Mol Biol Evol*. 37(4):1118–1132. eng. doi:10.1093/molbev/msz297.
- Reyes I. 2019. *regalia\_maxx\_14.02.2019*. *Bio Innovations*; [consultado el 16 de jun. de 2022]. 1–2. [http://www.sag.cl/sites/default/files/regalia\\_maxx\\_14.02.2019.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/regalia_maxx_14.02.2019.pdf).
- Rodriguez M. 2019. *Fusarium RT4*. *CropLife Latin America*; [consultado el 2 de jun. de 2022]. 1–15. <https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/el-mayor-enemigo-de-las-musaceas-parece-haber-llegado-al-continente-americano>.
- Statista Research Department. 2021. Principales países productores de hortalizas en América Latina. [sin lugar]: Statista; [actualizado el 2 de jun. de 2022; consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://es.statista.com/estadisticas/593365/volumen-de-produccion-hortalizas-america-latina-por-pais/>.
- Tapia C, Amaro J. 2014. Género *Fusarium*. *Chilena Infectol*; [consultado el 4 de jun. de 2022]. 31(1):85–86. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>.
- Walton Groves J, Loveland CA. 1953. The Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*; [consultado el 2 de jun. de 2022]. 45(3):415–425. <https://www.jstor.org/stable/4547710>.

## **Anexos**

### **Anexo A**

*Protocolo para la elaboración de agar papa dextrosa (PDA) solido para la inoculación in vitro.*

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 39 g de agar PDA
2. Añadir ~961 ml de agua destilada
3. Hervir para disolver
4. Autoclavar

## Anexo B

### *Protocolo para la inoculación de hongos*

Es importante trabajar con orden y realizando el menor movimiento posible dentro de la cámara de flujo laminar (movimientos sutiles). Evitar objetos que obstruyan el flujo del aire en el área donde se está trabajando, así como el uso de joyas o cualquier otro accesorio que interfiera con la inocuidad y el movimiento sutil de las manos.

1. Apagar el aire acondicionado para evitar la turbulencia en la cámara de flujo laminar.
2. Seleccionar el hongo para la siembra.
3. Encender y preparar la cámara de flujo laminar: limpiar y desinfectar con alcohol al 70% (para más información encontrar la guía al lado derecho de la cámara).
4. Seleccionar los medios de cultivos que se utilizarán y colocarlos en la cámara de flujo laminar. Dejarlos reposar alrededor 10 min antes de la siembra y quitar el agua que se condensó en la tapa de los platos.
5. Preparar los materiales: bisturí, mechero, fósforos, parafina, contenedor para sostener el bisturí desinfectado y contenedor con alcohol para desinfectar al 95%.
6. Desinfectar el bisturí con alcohol al 95%.
  - a) Llevar el bisturí sobre la llama del mechero para flamearlo.
  - b) Desinfectarlo con alcohol al 95%.
  - c) Repetir a y b nuevamente.
  - d) Dejarlo reposar para que se seque y enfríe.
7. Para la siembra es importante seleccionar el borde del hongo con hifas jóvenes. Realizar un corte pequeño cuadrangular y sembrarlo en el centro del plato con la parte de las hifas en contacto con el medio.

**Observación:** hacer movimientos sutiles porque se puede crear contaminaciones por migración de esporas.

8. Dejar reposar los platos abiertos alrededor de 10 minutos para eliminar el exceso de humedad y condensación de la muestra y el plato.
9. Sellar con parafina los platos, rotularlos y colocarlos en los contenedores de crecimiento.
10. Limpiar (quitando los residuos de medios de cultivo u hongos del bisturí), desinfectar y depositar los materiales utilizados en su lugar.
11. Apagar la cámara de flujo laminar.

**Anexo C**

*Protocolo para la elaboración de agar agua semisólido para inoculación de hojas de variedades del tomate (AA).*

El protocolo está determinado para preparar un litro de medio de cultivo.

1. Pesar 8 g de bacto-agar
2. Añadir ~992 mL de agua destilada
3. Autoclavar

## Anexo D

### *Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico.*

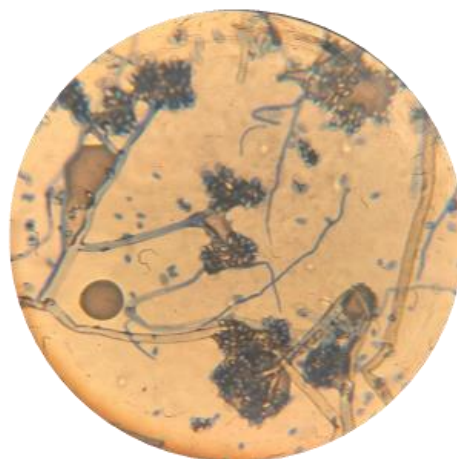
1. *Toma de fotografía y detalle de síntomas*, colocar el tejido enfermo en el centro de una hoja blanca. Escribir en la parte inferior el tipo de síntomas que presenta el tejido y un código de identificación de muestra con el siguiente formato: año, abreviatura de la planta y número de muestra (ej. 17zh#1). Colocar la fecha de recepción de muestra y preparación del explante en la parte superior del código. Tomar la fotografía de la muestra de tal manera que aparezcan todos los datos. Escribir detalladamente la sintomatología y adjuntarla al tablero de muestra.
2. *Preparación de explantes*, con un bisturí esterilizado realizar de 8-9 pequeños cortes del tejido de la interfase y sumergirlos en agua filtrada en un beaker esterilizado. Utilizar guantes y bisturí individuales para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.
3. *Preparación de material*, dentro de la cámara de flujo laminar colocar el material a utilizar: 2 beakers, 4 pinzas, mechero, fósforos, papel filtro, medio de cultivo, alcohol al 70% y agua destilada. Asegurarse que el material se encuentre esterilizado.
4. *Desinfección de explantes*, con una pinza esterilizada, transferir los explantes de la muestra a un beaker con una solución de hipoclorito (en un rango de 1-10%). Mantener la muestra de 3-5 minutos y menear el beaker para desinfectar los explantes.
5. *Lavado de explantes*, extraer los explantes sutilmente con una pinza esterilizada y transferirlos a un beaker con agua destilada estéril. Lavar los explantes por un minuto y repetir nuevamente el procedimiento.
6. *Secado de explantes*, finalmente extraer los explantes nuevamente con una pinza esterilizada y colocarlos sobre un papel filtro estéril para secarlos.
7. *Siembra de explantes*, transferir con una pinza esterilizada los explantes al medio de cultivo. Colocar de 6-7 explantes de manera uniforme y con la interfase en contacto con el medio.
8. *Rotulado*, sellar el medio con parafina y escribir el código, fecha y nombre de la persona que realizó la siembra.
9. *Incubación*, colocar las placas en la incubadora de 2-4 días para realizar las observaciones.

## Anexo E

### *Identificación de Botrytis spp.*

*Botrytis* fue reconocido por primera vez como género en 1792 por Micheli, donde después Persoon describe las características del hongo filamentoso refiriéndose a él como *Botrytis cinerascens*, no hasta 1832 en el Sistema Mycologicum, cuando se acepta el nombre de *Botrytis cinerea*, para la especie. (Walton Groves y Loveland 1953)

Para la identificación de *Botrytis*, se realizó un montaje en el laboratorio de fitopatología del Zamorano, donde anteriormente se tomaron muestras para realizar inoculaciones en dicho laboratorio, después de extraer la muestra, se impregno en un portaobjetos con el fin de añadir una gota de azul de lactofenol, para tener como resultados la coloración de los conidióforos, a continuación, se adhirió un cubreobjetos para realizar la observación en el microscopio con un enfoque de 40X. Al realizar la comparación con el estudio de (Espinosa de los Monteros 2006), se identificó a la *Botrytis* spp. por sus características morfológicas y estructurales, detallando al micelio por su coloración y diámetro de sus hifas. Visualizando en las imágenes del microscopio se puede evaluar las ramificaciones de los conidióforos en la zona apical, dichas ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias que disponen en su zona terminal un conidio o vesícula globosa. Fotografía de *Botrytis* spp. en microscopio



## Anexo F

### *Identificación Fusarium spp.*

Según Nelson et al. (1994), *Fusarium* spp. es un género muy heterogéneo, difícil de identificar y clasificar. Además, uno de los problemas en taxonomía de hongos se debe a la doble nomenclatura, una parte sexual y asexual. “La taxonomía clásica de *Fusarium* se ha basado en la definición de los caracteres morfológicos presentes en el hongo y características de crecimiento en cultivo.” (Leslie y Summerell 2006)

Para la identificación de *Fusarium* spp., se realizó un montaje en el laboratorio de fitopatología del Zamorano, donde anteriormente se tomaron muestras para realizar inoculaciones en dicho laboratorio, después de extraer la muestra, se impregno en un portaobjetos con el fin de añadir una gota de azul de lactofenol, para la coloración de los conidióforos, a continuación, se adhirió un cubreobjetos para realizar la observación en el microscopio con un enfoque de 40X. Según Tapia y Amaro (2014) para la identificación de *Fusarium* spp., “la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; corta o larga; monofiálica (que emerge esporas de un poro de la fiálide) o polifiálica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas; todas observables a la lupa (40x)”. Además, se puede identificar *Fusarium* spp. debido al micelio que desarrollan, dependiendo de la especie ya que pueden ser pigmentación blanquecina, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc. Estas coloraciones también pueden variar según los diferentes medios de cultivo. (Monzón y Rodríguez 2010)

