

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la vida**

**Análisis de la virulencia y resistencia a fungicidas de *Fusarium
oxysporum* patógeno de zarzamora**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Lenis Sorley Bonilla Pabón

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Lenis Sorley Bonilla Pabón

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Domingo Martínez soto
Director de tesis

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dr. Roberto Cruz Flores



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Lenis Sorley Bonilla Pabón** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Análisis de la virulencia y resistencia a fungicidas de *Fusarium oxysporum* patógeno de zarzamora

Resumen aprobado por:

Dr. Domingo Martínez Soto
Director de tesis

México es el principal productor mundial zarzamora y Michoacán el estado que concentra la mayor parte de la producción nacional. Sin embargo, la producción de zarzamora se ha visto severamente afectada por la enfermedad conocida como marchitez vascular causada por el *hongo Fusarium oxysporum*, la cual ha provocado pérdidas de alrededor de 3000 ha entre el 2011 hasta el 2015, y de 2500 ha en el 2020. El objetivo general de este proyecto fue analizar la virulencia y la resistencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* a fungicidas. Se utilizaron siete aislados procedentes de los municipios de los Reyes y Peribán, muestreados de plantas de zarzamora variedad “Tupy” sintomáticas del estado de Michoacán. Así mismo se incluyeron los aislados de referencia GL 1804 y F3001 procedentes de Estados Unidos. Los aislados Fo1, Fo3, Fo7 y GL1804 fueron seleccionados para realizar las pruebas de virulencia donde se encontró que el aislado más virulento fue Fo1 el cual mató a la mayoría de las plantas entre 23 y 27 días. Por otra parte, los aislados Fo1 y Fo7 mostraron similitud en el grado de virulencia y el GL1804 fue el aislado menos virulento. No obstante, las diferencias estadísticamente significativas en virulencia se detectaron únicamente entre Fo1 y GL1804. También Se determinó el porcentaje de tolerancia de estos aislados al confrontarse con 15 diferentes fungicidas (11 químicos – dos orgánicos y dos a base de extractos de plantas), realizándose el crecimiento de cada cepa en cuatro diferentes tratamientos, 1, medio mínimo con fungicida, 2, medio mínimo sin sacarosa y con fungicida, 3, medio mínimo como control 4, Medio mínimo sin sacarosa como control. Se encontró que el extracto de gobernadora *Larrea tridentata* fue el fungicida más efectivo al inhibir al 100% el crecimiento de todos los aislados estudiados, igualmente los fungicidas extractos vegetales, carbendazim, tiabendazol, cyprodonil y fludioxonil, dodina y trifumizol resultaron ser eficaces. Por otro lado, todos los aislados mostraron resistencia a los fungicidas mancozeb, metalaxil, aceite de tomillo. Los aislados de México resultaron ser más resistentes a la mayoría de los fungicidas en comparación con los dos aislados de U.S.A.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, virulencia, resistencia, fungicidas, zarzamora

Abstract of the thesis presented by **Lenis Sorley Bonilla Pabón** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences.

Analysis of the virulence and resistance to fungicides of *Fusarium oxysporum* pathogen of blackberry

Abstract approved by:

Dr. Domingo Martínez Soto
Thesis Director

México is the world's leading producer of blackberries, and Michoacán is the state with the most significant national production. However, blackberry production has been affected by the blackberry wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*. From 2011 to 2015, this disease provoked losses of around 3000 ha; in 2020, it caused losses of 2,500 ha. This research aimed to analyze the virulence and resistance to the fungicides of *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*. Seven fungal isolates were collected from symptomatic blackberry plants cv "Tupy" in Los Reyes and Periban municipalities from Michoacan State, México. Also, the fungal isolates GL1804 and F3001 collected in California were included in this work. The isolates Fo1, Fo3, Fo7, and GL1804 were chosen for virulence tests. The plants inoculated with Fo1 died earlier, at 23 to 27 days post-infection (dpi), compared to plants inoculated with Fo3, Fo7, and GL1804. The isolates Fo3, Fo7, and GL1804 showed the same degree of virulence, and Fo1 showed a significantly more virulent behavior. Furthermore, this study determined the tolerance of all isolates to 15 fungicides (11 chemicals, two organics, two from plant extracts). Each strain was treated under four conditions: 1, minimal culture medium plus fungicide; 2, minimal culture medium without sucrose plus fungicide; 3, minimal culture medium as a control; and 4, minimal culture medium without sucrose as a control. The results revealed that the fungicide governor extract (*Larrea tridentata*) was 100% effective in inhibiting the growth of *F. oxysporum*. In addition to plant extracts, the fungicides carbendazim, thiabendazole, cyprodonil, fludioxonil, dodine, and triflumizole were effective against *F. oxysporum*. Interestingly, all strains showed tolerance to the fungicides mancozeb, metalaxil, and thyme oil. Under a global view of the results, the fungal isolates collected from México were more resistant to fungicides than those collected in California.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, virulence, resistance, fungicide, blackberry

Dedicatoria

En memoria a mi Padre Pablo Otoniel Bonilla Suárez, quien trascendió mientras me encontraba terminando este trabajo.

A mi hijo Daniel Mathias Cárdenas Bonilla ,quien me acompañó en esta aventura.

A mi madre María Inés Pabón, por su infinito amor.

A mi amiga Verónica Lucía Rodríguez Fuerte, por confiar siempre en mí.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca de manutención que se me otorgó para realizar mis estudios de maestría. Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por la oportunidad de continuar con mis estudios académicos en sus instalaciones. Al programa de ciencias de la vida por aceptar mi solicitud.

Al Dr. Domingo Martínez Soto por su apoyo académico, personal durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria y al Dr. Roberto Cruz Flores por sus sugerencias, comentarios para lograr una mejor versión de este trabajo.

A la Dra. Rufina Hernández Martínez por la donación de algunos de los fungicidas utilizados y compartir su conocimiento.

Al Maestro en Ciencias Gamaliel Valdivia Rojas por donación de las plantas de zarzamora.

Al Dr. Raúl Alcalde Vázquez por su colaboración en el procesamiento de las muestras de cromatografía Líquida.

Al grupo de Investigación del Dr. Domingo Martínez: Elías Trujillo, Ponce Amaury, Erisneida Campo, Ricardo Martínez, por su ayuda en la realización de este trabajo.

A Patsy Itzanamy Lara Castillo Por su colaboración en este proyecto.

A los estudiantes de Bioingeniería Víctor, Isabel, Cindy quienes colaboraron en diferentes procesos de esta investigación.

A la estudiante de verano Mariana por su apoyo con algunos procesos de microscopía.

A Ricardo Rodríguez Vargas por su apoyo y asesoría en la realización de gráficos y análisis estadísticos.

A Sophía González Martínez por toda su ayuda profesional y personal, gracias y mil gracias.

A Gema, Fanny, Grecia, Jorge, Diego, en general a todos los integrantes del laboratorio de microbiología por su ayuda en diferentes actividades.

Dr. Daniel Salgado por su asesoría en diferentes experimentos y préstamo de algunos reactivos.

A la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete por el préstamo de material de laboratorio, equipos.

Al Dr. Diego Salcedo por su ayuda en la obtención de imágenes de microscopia.

A los diferentes miembros del departamento de microbiología por todo su apoyo profesional, personal.

A Luz América Córdoba por su amistad, ayuda, consejos.

A la psicóloga Yahaira Castañeda por su apoyo psicológico, personal y por darme herramientas para no renunciar a este sueño.

A don Rafa, Amparo, y todos aquellos que de una manera u otra me apoyaron para poder terminar esta maestría

A los integrantes de la biblioteca, Oscar, Daniel, Elizabeth, Yendy, Blanca Rosa por su excelente trabajo y estar siempre dispuestos a colaborar y a servir a los estudiantes.

Al personal de servicios escolares especialmente a Nadua por estar siempre dispuestos a colaborar con todas las inquietudes y preguntas de los estudiantes.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 La Zarzamora	2
1.1.2 Producción de la zarzamora en México.	2
1.1.3 La marchitez de la zarzamora.....	3
1.1.4 <i>Fusarium oxysporum</i>	3
1.1.5 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>mori</i>	4
1.1.6 Control de <i>F. oxysporum</i>	5
1.1.7 Resistencia a fungicidas.....	6
1.1.8 <i>Fusarium oxysporum</i> resistente a fungicidas	6
1.2 Origen de Aislados e identificación	7
1.3 Justificación	10
1.4 Hipótesis.....	10
1.5 Objetivos	10
1.5.1 Objetivo general	10
1.5.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología	12
2.1 Cepas estudiadas.....	12

2.2	Crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	12
2.3	Crecimiento de plantas de zarzamora	12
2.4	Infección de plantas de zarzamora con <i>F. oxysporum</i>	13
2.5	Observación de la colonización de las raíces de zarzamora por <i>F. oxysporum</i>	13
2.6	Análisis de la resistencia de <i>F. oxysporum</i> a fungicidas	14
2.7	Cuantificación relativa de la cantidad de ingrediente activo del fungicida Metalaxil absorbido/adsorbido por <i>F. oxysporum</i>	16
2.7.1	Curva de crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	16
2.7.2	Obtención de muestra para la determinación de la concentración de metalaxil en la biomasa fúngica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	17
2.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	17
Capítulo 3.	Resultados.....	18
3.1	Características morfológicas de <i>F. oxysporum</i>	18
3.2	Infección de plantas de zarzamora con <i>F. oxysporum</i> y cuantificación de la virulencia.....	18
3.3	Análisis de la resistencia de <i>F. oxysporum</i> a fungicidas	22
3.4	Curva de Crecimiento <i>F. oxysporum</i>	29
3.5	Determinación de la concentración de Metalaxil en donde se observó una mayor producción de biomasa fúngica.....	29
3.6	Obtención de la muestra para determinación de la cantidad de Metalaxil en la biomasa de los hongos mediante HPLC.....	30
Capítulo 4.	Discusión	32
Capítulo 5.	Conclusiones.....	36
Capítulo 6.	Recomendaciones	37
	Literatura citada	38
	Anexos	44

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Sitios de muestreo	8
Figura 2. Árbol filogenético de los aislados de <i>F. oxysporum</i>	9
Figura 3. Características morfológicas de <i>F. oxysporum</i> .	18
Figura 4. Plantas infectadas con <i>F. oxysporum</i> .	19
Figura 5. Cuantificación de la virulencia causada por los aislados de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>mori</i> en plantas de zarzamora	20
Figura 6. Imágenes representativas de los síntomas observados en los tallos de las plantas inoculadas con los diferentes aislados de <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>mori</i>	20
Figura 7. Colonización de <i>F. oxysporum</i> en las raíces de las plantas.	21
Figura 8. Mapa de calor mostrando los porcentajes de tolerancia de los hongos a los fungicidas en medio de cultivo con sacarosa	24
Figura 9. Mapa de calor mostrando los porcentajes de tolerancia de los hongos a los fungicidas en medio de cultivo sin sacarosa	25
Figura 10. Imágenes representativas de las colonias en medio mínimo con Jabalí (fosetil al)	26
Figura 11. Imágenes representativas de las colonias en medio mínimo con Tokat 240 ce (metalaxil)	27
Figura 12. Imágenes representativas de las colonias control, medio mínimo sin fungicida	28
Figura 13. Curva de crecimiento <i>F. oxysporum</i> 3	29

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Identificación molecular de los aislados <i>F. oxysporum</i>	8
Tabla 2. Aislados estudiados . *cepas donadas por la U.S.D.A	12
Tabla 3. Concentración de fungicidas	15
Tabla 4. Fungicidas actualmente usados por los productores de zarzamora	15
Tabla 5. Resultados Infección de plantas de Zarzamora con <i>F. oxysporum</i>	46
Tabla 6. Promedios de crecimiento(cm) de <i>F. oxysporum</i> vs fungicidas	47
Tabla 7. Fungicidas, mecanismos de acción y tolerancia	23
Tabla 8. Aislados con diferencias significativas Tratamiento 1	48
Tabla. 9. Aislados con diferencias significativas Tratamiento 2	49
Tabla 10. Datos para la obtención de la curva de crecimiento de <i>F.oxysporum</i> 3	50
Tabla 11. Determinación de la concentración de metalaxil en relación con la biomasa fúngica	30
Tabla 12. Obtención biomasa fúngica para determinación del metalaxil mediante HPLC	31

Capítulo 1. Introducción

En la última década la producción mundial de fruta ha aumentado alrededor de un 63.11 % pasando de 572 a 933 millones de toneladas métricas (Oruz., 2024). Las bayas como la fresa, zarzamora, arándanos y la frambuesa; han destacado por su sabor característico y su alto valor nutritivo, al ser fuente de minerales como calcio, fósforo, hierro, magnesio, potasio; así como también de vitaminas E, C, y A. Además, se les atribuyen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes al contener gran cantidad de compuestos fenólicos (Diaconesa et al., 2014; Cosme et al., 2022).

En México, durante el año 2023 las bayas ocuparon el tercer lugar con mayor valor de exportación, correspondiente a 3936 millones de dólares, siendo la producción total en el país de 1,15 millones de toneladas cultivadas en una superficie de 42,975 hectáreas. En el grupo de las bayas se destaca la zarzamora por ser México el principal productor mundial de este fruto. (SIAP.,2024)

El cultivo de la zarzamora se ve afectado por diversas enfermedades causadas principalmente por hongos, las cuales generan pérdidas anuales por 2,540 millones de pesos equivalentes a un 25% de la producción. Entre las principales enfermedades se encuentra el moho gris causado por *Botrytis cinérea*, el mildiú de la zarzamora provocado por *Peronospora sparsa*, la cenicilla cuyo agente responsable es *Podosphaera aphanis*, la antracnosis causada por *Colletotrichum gloriosporoides* y la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* (Contreras et al., 2019). Esta última ha causado pérdidas significativas en la producción de la zarzamora en México, siendo afectadas alrededor de 3000 ha desde el 2011 hasta el 2015 (Hernández-Cruz et al., 2015), y alrededor de 2500 ha en el 2020.(Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 2022)

Existen varias estrategias para el control de *F. oxysporum*, por ejemplo, la obtención de variedades vegetales resistentes, la rotación de cultivos, y la aplicación de hongos antagonistas al patógeno. Sin embargo, hasta el momento no se han postulado variedades resistentes de zarzamora a *F. oxysporum*. La rotación de cultivos es limitante en el control de *F. oxysporum* debido a que el hongo presenta crecimiento saprofítico, posee estructuras de resistencia como las clamidosporas, y la facilidad con que sus esporas pueden ser transportadas por el viento a largas distancias (Campo, 2014).

En los últimos años, las investigaciones se han enfocado en encontrar estrategias de control de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum*, centrándose en la aplicación de fungicidas como procloraz,

tiabendazol, difenoconazol, microorganismos de promoción de crecimiento de las plantas y de inducción de resistencia a fitopatógenos; tratando de realizar un manejo integral de la enfermedad, pero obteniéndose resultados medianamente eficaces (Rebollar y silva, 2021). Aunque estos estudios han aportado al control del patógeno, los casos de marchitez vascular de la zarzamora frecuentemente reportados hacen evidente que se requiere más investigación que permitan obtener conocimiento de la biología de *F. oxysporum* f. sp. *mori* y su interacción con la planta de zarzamora para desarrollar estrategias de control más efectivas. Por ello, en el presente estudio se analizó la virulencia de aislados de *F. oxysporum* provenientes de los sitios con mayor producción de zarzamora en el estado de Michoacán, y se comparó con cepas del mismo hongo caracterizadas previamente por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA por sus siglas en inglés). También, se evaluó la resistencia a fungicidas de *F. oxysporum* f. sp. *mori*, y su capacidad para bioacumular los fungicidas en sus células. Este trabajo, contribuye a la búsqueda de soluciones al control de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* en plantas de zarzamora, y sienta las bases para la aplicación de técnicas avanzadas que permitan dilucidar los mecanismos moleculares de la resistencia a fungicidas en *F. oxysporum* f. sp. *mori*, y durante su interacción con plantas de zarzamora.

1.1 Antecedentes

1.1.1 La Zarzamora

La zarzamora pertenece al género *Rubus* y a la familia de las rosáceas. La principal especie cultivada en México es *Rubus eubatus* variedad “Tupy”, que se encuentra desde las zonas de alta montaña hasta el ecuador (Cancino et al., 2011). El género *Rubus* se caracteriza por su variabilidad morfológica, incluyendo especies leñosas y arbustivas, así como pequeñas herbáceas trepadoras con láminas foliares reducidas. Su producción se da en climas frescos y soleados que oscilan entre los 16 y 25 °C. (Clark et al., 2007).

1.1.2 Producción de la zarzamora en México.

México es el principal productor mundial de este cultivo, con una producción de 238,000 toneladas y un ingreso de 777 millones de dólares. Los estados con una mayor productividad en zarzamora son: Michoacán, Jalisco, Baja California, Sinaloa, Colima y Puebla. El estado de Michoacán con 214,706

toneladas representó el 80% de la producción nacional con un valor de 5,020 millones de pesos, posicionándose como el primer productor a nivel nacional (SIAP.,2024).

Brazos fue la primera variedad cultivada en México. Sin embargo, se fueron introduciendo al país nuevas variedades como la “Tupy” que tiene menores requerimientos de horas frío y debido a sus características es la variedad mayormente cultivada en México (Rivas, sf). La producción de la zarzamora en el país se establece mayormente en el estado de Michoacán donde las condiciones climáticas son más favorables para el cultivo, al presentarse una época de lluvias ya establecida con periodos cortos de frío. Se lleva a cabo mediante la práctica cultural denominada producción forzosa la cual consiste en una defoliación química causada principalmente por urea y sulfato de cobre, posterior a la poda y finalmente la aplicación de reguladores decrecimiento como el ácido giberélico. (Rivas, sf).

1.1.3 La marchitez de la zarzamora

La marchitez de la zarzamora apareció por primera vez en California en el condado de Watsonville en el año 2007, identificado como su agente causal a *Fusarium oxysporum* (Gordon et al., 2016). Posteriormente la enfermedad fue detectada en el municipio de Los Reyes en el Estado de Michoacán entre los años 2011-2012 y reportada en el 2015 (Hernández et al., 2015). Se observaron plantas de zarzamora con síntomas de marchitez vascular con cambio de color y flacidez en los brotes, y finalmente secamiento de la planta, y aparición de franjas color café oscuro que se extienden desde la base del tallo hacia arriba. En plantas adultas, las hojas bajas adquieren un color amarillo, que va progresando hasta llegar al secamiento de estas. La enfermedad se ha propagado a otros municipios de Michoacán como Tacámbaro y Ario de Rosales, También se ha observado en la zona agrícola de los Estados de Baja California y el sur de Jalisco. (Rebollar y silva.,2021).

1.1.4 *Fusarium oxysporum*

El hongo ascomiceto filamentoso *F. oxysporum*, integrante del Complejo de Especies *F. oxysporum* (FOSC por sus siglas en inglés) es un habitante frecuente del suelo. Entre sus características morfológicas se encuentra la formación de falsas cabezas, la formación de macroconidios de longitud media o corta, doblados o casi rectos, y bi o triseptados, Los microconidios presentan diferentes formas desde

reniformes, elípticos u ovalados. A partir de las hifas del hongo, se pueden demorar en formarse de cuatro a seis semanas las clamidosporas. (Leslie y Summerell, 2006)

En la naturaleza existen hongos *F. oxysporum* fitopatógenos, endófitos, y patógenos de humanos. El hongo *F. oxysporum* ha sido clasificado como el quinto hongo fitopatógeno de mayor interés económico y científico en el mundo (Dean et al., 2012). Este hongo, puede colonizar más de 100 especies, y su interés agrícola radica en la diversidad de sus hospederos y su capacidad para inducir múltiples enfermedades en plantas. Generalmente, cada aislado fitopatógeno de *F. oxysporum* pueden infectar a un solo hospedero, de ahí que estos hongos son descritos como formas especiales (Huasini et al., 2018).

1.1.5 *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*

En el 2017 Pastrana y colaboradores estudiaron diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* obtenidos de plantas de zarzamora enfermas en México y California para observar su patogenicidad y su variación genética de acuerdo con los grupos de compatibilidad vegetativa. Encontrando que efectivamente la mayoría de aislados eran patogénicos para las plantas de zarzamora, y un solo aislado resulto ser patogénico también para plantas de fresa. De igual forma de acuerdo con sus análisis filogenéticos y de grupos de compatibilidad vegetativa propusieron una nueva forma especial de *F. oxysporum* llamada *F. oxysporum* f. sp. *mori*, como agente causal de la marchitez vascular de la zarzamora. En esta investigación los autores abren la posibilidad a que el hongo no sea un patógeno específico de zarzamora, sino que afecte también al cultivo de la fresa. Igualmente muestran la variabilidad genética que existe entre los diferentes aislados de California indicando diferencias en los grados de virulencia de los aislados.

Sin embargo, en el 2020 Hernández y colaboradores concluyen que el agente causal de la marchitez de la zarzamora en México es un complejo de especies de *Fusarium*. A partir de muestras de raíces, tallos y coronas de plantas de zarzamora sintomáticas y mediante herramientas moleculares, encontraron que un nuevo linaje de especies de *F. oxysporum* estaba agrupado en el mismo grupo que *F. oxysporum* f. sp. *mori* y relacionado muy cercanamente a *F. cuagenense*.

Finalmente, en el 2021 Pastrana y colaboradores comprobaron que plantas silvestres de zarzamora sirven de reservorio del patógeno *F. oxysporum* y de esta forma llega la infección a plantas cultivables.

1.1.6 Control de *F. oxysporum*

Las últimas investigaciones de la marchitez de la zarzamora en México se han centrado en metodologías integradas para poder controlar al agente causal de la enfermedad. Es así como en el 2020 Hernández y colaboradores, realizan un programa de manejo *in vivo* en campos del municipio de Los Reyes durante los años 2014 al 2016 utilizando plantas de zarzamora variedad “Tupy”. Los autores realizaron 13 diferentes tratamientos con productos comerciales como fungicidas químicos, agentes de control biológico e inductores de resistencia en plantas con diferentes aplicaciones durante dos a tres semanas. Ellos encontraron una reducción en la severidad de la enfermedad al utilizar el complejo enzimático Maya Mayic 2001 (compuesto por *Azotobacter vinelandii*, *Clostridium pasteurianum*, etc.) en combinación con la aplicación de los fungicidas procloraz, difenoconazol, y Kendal Nem (inductor de resistencia en plantas). La aplicación con azoxystrobin y acibezolar-s-metil dieron resultados medianamente eficaces. Por otra parte, concluyeron que el fosfito de potasio fue ineficaz para el control del patógeno, lo que indica una posible resistencia de *Fusarium* a este fungicida.

Acosta-González y colaboradores en el 2022 realizaron una comparación *in vitro* de los diferentes fungicidas y bio-controladores para el manejo de *F. oxysporum* en la marchitez de la zarzamora. Los autores encontraron que el fungicida procloraz, resultó ser el más efectivo contra seis aislados de *F. oxysporum* probados; seguido del metil- tiofanato y azoxystrobin. Sin embargo, comprobaron la ineficacia del fosfito de potasio en el control de *F. oxysporum*, corroborando los resultados obtenidos por Hernández y colaboradores en el 2020.

Es importante destacar que los autores concluyen que los productos a base de fósforo han sido usados por más de 25 años en el control de enfermedades como el mildiú vellosa en la zarzamora, por lo que no se puede descartar la resistencia de *F. oxysporum* a este fungicida. Rebollar y Silva en el 2021 publicaron un libro dedicado al manejo integral de la marchitez de la zarzamora, en el cual se aborda la enfermedad a partir de las características del patógeno, su proceso de infección y los métodos de dispersión. Posteriormente, analizan el cultivo de la zarzamora destacando la susceptibilidad de la variedad “Tupy” a la enfermedad (Rebollar y Silva., 2021). Realizan estudios *in vitro* e *in vivo* para observar el rango de hospederos del patógeno, encontrando que contrario a los resultados de Pastrana y colaboradores en el 2017, *F. oxysporum* f. sp. *mori* afecta únicamente a la zarzamora y no a la fresa. Por lo tanto, recomiendan la rotación de cultivos como una alternativa de control. Finalmente, observan cómo influyen las condiciones ambientales en el desarrollo, incidencia y severidad de la enfermedad de acuerdo con las concentraciones de hierro, calcio, materia orgánica, cobre y la variación del pH. También destacan como

el mecanismo de defensa de las plantas se ve afectado al incrementarse la temperatura y la sequía, lo que hace que sea más susceptible al ataque del patógeno. Los autores recomiendan el uso de fungicidas tales como procloraz, difenoconazol y tiabendazol; así como la aplicación de microorganismos de promoción y resistencia (Rebollar y silva., 2021).

1.1.7 Resistencia a fungicidas

La resistencia a fungicidas se puede definir según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (FRAC) como la disminución adquirida y heredable en la sensibilidad de un hongo al ingrediente activo de un fungicida. Mediante esta resistencia el hongo puede sobrevivir a aplicaciones del químico, multiplicándose y propagándose (Carmona y Sautua., 2017).

Entre los factores que influyen en la resistencia a fungicidas está la biología y la variabilidad intrínseca del patógeno y los mecanismos de acción de los fungicidas. También el manejo agronómico en las aplicaciones del químico, tomando gran importancia el número total de aplicaciones, la dosis suministrada, y la aplicación continua de fungicidas con el mismo modo de acción (Carmona y Sautua, 2017).

1.1.8 *Fusarium oxysporum* resistente a fungicidas

Existen varios reportes de *F. oxysporum* presentando resistencias a diversos fungicidas, por ejemplo: *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* and *F. oxysporum* f. sp. *lilii* mostraron diferentes niveles de resistencia a cuatro fungicidas del grupo benzimidazol (benomil, metil-tiofanato, carbendazim y tiabendazol). De 24 aislados de *F. oxysporum* probados, once fueron altamente resistentes, nueve medianamente resistentes y 16 susceptibles al metil-tiofanato y al benomil (Chung et al., 2009). Por otra parte, *Fusarium* sp obtenidos de suelo y cultivos de trigo, presentó resistencia al azoxystrobin y carbendazim. (Frac et al., 2016). A partir de 100 cepas de *F. oxysporum* f. sp. *niveum* aislados de sandía durante los años de 2012-2013 en Georgia-USA, encontraron que 4%, 84% y 12% de los aislados fueron resistentes, medianamente resistentes, y susceptibles al metil-tiofanato, respectivamente (Petkar et al., 2017).

Gonzáles y colaboradores en el 2022 evaluaron la susceptibilidad de doce cepas de *F. oxysporum* aislados de plantas sintomáticas de vainilla a cuatro fungicidas comerciales metil-tiofanato (Cercobin M®), benomyl (Promyl®), carbendazim (Prozycar®), and chlorothalonil (Talonil 75®) encontrando que los aislados fueron

altamente resistentes al clorothalonil y al metil-tiofanato y susceptibles al carbendazim y benomil. Diferentes especies de *Fusarium* presentaron resistencia al fludioxonil tanto en cultivos de cebolla como de papa (Shin et al., 2023, Akosah et al., 2023).

Zheng y colaboradores en el 2018 estudiaron principalmente las mutaciones del dominio motor FoMyo5 que estaban involucradas en el mecanismo de defensa de *F. oxysporum* al fungicida Fenamacril. Usaron seis cepas (patogénicas en humanos, fitopatogénicas; y no patogénicas) de *F. oxysporum* encontrando una resistencia natural al fenamacril por parte de las cepas afectando plantas, mientras que la cepa patógena de humanos mostraba ser poco resistente al mismo fungicida. La clave de la resistencia estaba dada por la mutación en el codón que codifica para los aminoácidos Val 151 y Ser418.

1.2 Origen de aislados e identificación

Los siete hongos *F. oxysporum* con los que se trabajó en este proyecto fueron aislados de plantas sintomáticas de zarzamora variedad “Tupy”, recolectadas en los municipios de Los Reyes y Peribán, principales zonas productoras de esta fruta en el Estado de Michoacán (Figura 1). Los hongos fueron identificados previamente mediante la amplificación y secuenciación de las regiones espaciadoras internas transcritas (Internal Transcribed Spacer-ITS) y el factor de elongación de la traducción (TEF1 α) (tabla 1) y con esta información se realizó el árbol filogenético (Figura 2). La identificación macroscópica, microscópica y molecular de los aislados fúngicos se realizó en el Laboratorio de Biología de Hongos del Departamento de Microbiología del Centro de Investigación Científica y Educación superior de Ensenada Baja California (CICESE).

En la Figura 1. Se puede observar en morado el estado de Michoacán, en verde los municipios donde se colectaron las muestras y en rosado los puntos exactos de muestreo. En la Figura 2 se muestra que los aislados quedaron agrupados entre los *F. oxysporum* f. s.p. *fragariae* y *F. oxysporum* f. s.p. *mori* a excepción del Fo5 que quedo agrupado cerca al *F. oxysporum* f. s.p. *spinaciae*.

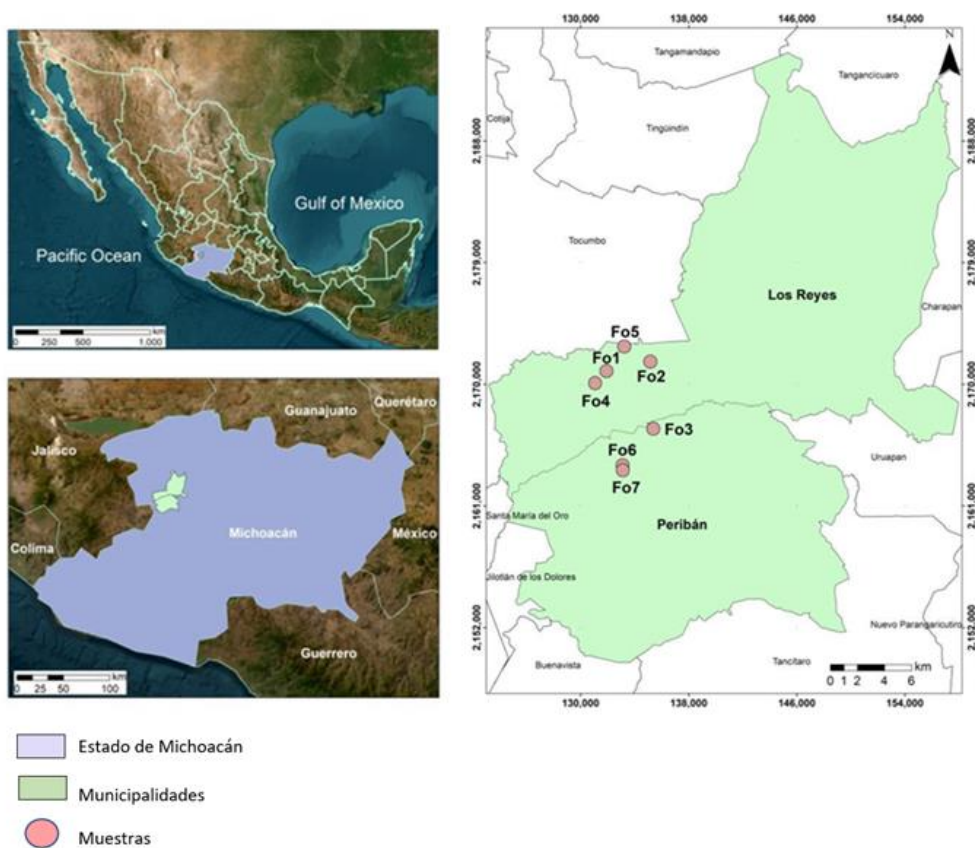


Figura 1. Sitios de muestreo

Tabla 1. Identificación molecular de los aislados *F. oxysporum*

Aislado	ITS/TEF1 α
Fo1	<i>F. oxysporum</i>
Fo2	<i>F. oxysporum</i>
Fo3	<i>F. oxysporum</i>
Fo4	<i>F. oxysporum</i>
Fo5	<i>F. oxysporum</i>
Fo6	<i>F. oxysporum</i>
Fo7	<i>F. oxysporum</i>

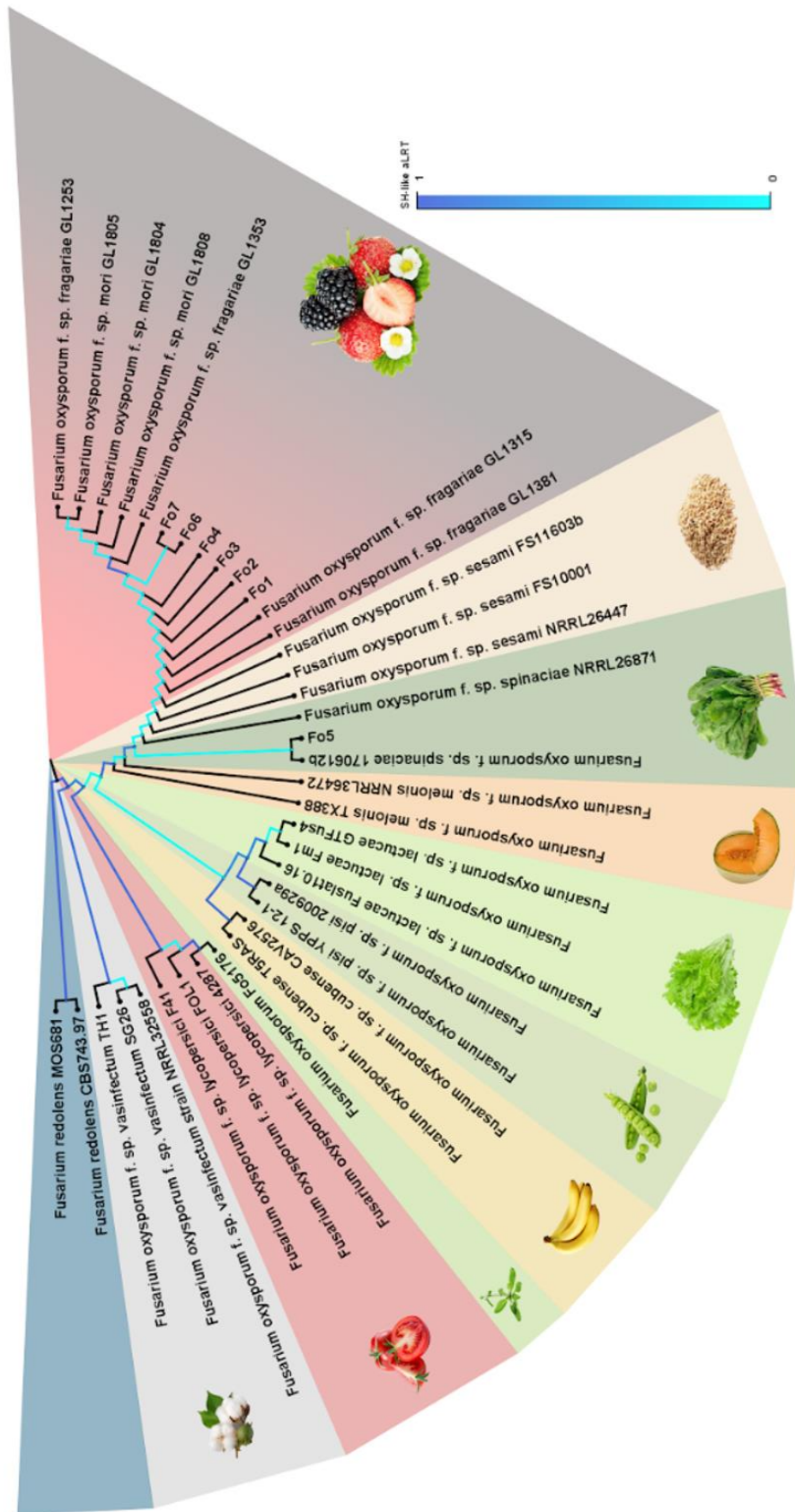


Figura 2. Árbol filogenético de los aislados de *F. oxysporum*.

1.3 Justificación

Fusarium oxysporum f. sp. *mori* agente causal de la marchitez de la zarzamora ha causado pérdidas económicas en la producción de la zarzamora en el estado de Michoacán del 30 al 100 % devastando alrededor de 3000 hectáreas desde el 2011 hasta el 2015, 2500 ha en el 2020. Aunque se han realizado diferentes investigaciones y esfuerzos para controlar la enfermedad, a la fecha no se ha logrado su control y las pérdidas económicas por marchitez vascular de la zarzamora continúan incrementándose. Además, se desconocen las bases biológicas de la enfermedad y de los mecanismos moleculares que participan en la interacción entre *F. oxysporum* f. sp. *mori* y plantas de zarzamora, así como la resistencia del patógeno a fungicidas. Por estas razones, en el presente proyecto se analizó la virulencia y resistencia a fungicidas de *F. oxysporum* f. sp. *mori*. Esto permitirá generar nuevo conocimiento que contribuya lograr un manejo integral de la *enfermedad*, y con ello disminuir las pérdidas por marchitez de la zarzamora en el país.

1.4 Hipótesis

Los *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* aislados en México son más virulentos y resistentes a fungicidas que los *F. oxysporum* f. sp. *mori* aislados en cultivos de zarzamora en California.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Analizar la virulencia y resistencia a fungicidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Comparar la virulencia de diferentes *Fusarium oxysporum* aislados de plantas de zarzamora con síntomas de infección en México, con cepas del mismo hongo reportadas en California
2. Determinar la resistencia a fungicidas de los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*

3. Determinar la capacidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* para la absorción/adsorción del fungicida

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas estudiadas

Se trabajaron con las cepas presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Aislados estudiados .

I.D	Hongo	Procedencia
Fo1	<i>F. oxysporum</i>	México
Fo2	<i>F. oxysporum</i>	México
Fo3	<i>F. oxysporum</i>	México
Fo4	<i>F. oxysporum</i>	México
Fo5	<i>F. oxysporum</i>	México
Fo6	<i>F. oxysporum</i>	México
Fo7	<i>F. oxysporum</i>	México
*GL1804	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>mori</i>	U.S.A
*F3001	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>mori</i>	U.S.A

*Donadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA)

2.2 Crecimiento de *F. oxysporum*

El crecimiento de *F. oxysporum* se realizó en medio comercial Agar Papa Dextrosa(MCD LAB, 8612) a 25° C. Para la obtención de conidios se inocularon 5 tapones de micelio del hongo en medio líquido de nitratos (Anexo A) a 130 rpm, a una temperatura de 28° C por 3 días. Posteriormente se realizó la obtención de conidios mediante la filtración del cultivo en fibra sintética y en condiciones estériles. Para observar algunas estructuras (macroconidias y microconidias) de *F. oxysporum*, se sembró el hongo en agar de hojas de clavel (CLA). (Anexo A)

2.3 Crecimiento de plantas de zarzamora

Se obtuvieron plantas de zarzamora libres de enfermedades proporcionadas por productores de bayas y el Instituto Tecnológico Superior de los Reyes Michoacán (ITSLR-TecNM), de aproximadamente un mes de

edad, las cuales fueron trasplantadas en bolsas con sustrato (Cosmopeat) mezclado con perlita (Multiperl® Hortícola, 0.83130224) y mantenidas en temperatura ambiente y condiciones naturales de luz-oscuridad hasta llevar a cabo los ensayos de infección.

2.4 Infección de plantas de zarzamora con *F. oxysporum*

Considerando la distribución de los aislados de *F. oxysporum* en el filograma, se seleccionaron los aislados Fo1, Fo3, y Fo7 para realizar los ensayos de infección y virulencia en plantas de zarzamora. También se incluyó la cepa GL1804, un aislado de California caracterizada previamente como altamente virulento .

Siete plantas de zarzamora variedad “Tupy” de cinco meses de edad y con apariencia saludable fueron inoculadas con los aislados Fo1, Fo3, Fo7, GL1804, e inoculación simulada agua destilada estéril. Las plantas fueron removidas del sustrato, las raíces se lavaron con agua corriente hasta eliminar la mayor cantidad posible de sustrato, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Después, las raíces de las plantas de zarzamora se sumergieron en una suspensión de 1×10^7 conidios de *F. oxysporum* o en agua destilada estéril como control por un tiempo de 90 minutos. Pasado este tiempo las plantas fueron replantadas en sustrato adicionado con perlita estéril y mantenidas bajo condiciones de invernadero. Se les realizó un monitoreo de las plantas durante 75 días y al final de este tiempo se cuantificaron los síntomas observados en las plantas con la escala reportada por Ayhan y colaboradores en el 2025: 1, plantas sin síntomas; 2, plantas con hojas marchitas y áreas cloróticas; 3, plantas con hojas marchitas, áreas cloróticas y manchas necróticas; 4, plantas con hojas marchitas y plantas enteras con clorosis, áreas de necrosis y defoliación; y 5, plantas muertas.

2.5 Observación de la colonización de las raíces de zarzamora por *F. oxysporum*

La observación de la colonización de las raíces de las plantas de zarzamora por los aislados de *F. oxysporum* y la cepa GL1804 se realizó mediante el protocolo descrito por Martínez-Soto et al., 2023 y Martínez-Soto et al., 2025. Brevemente, las plantas con síntomas junto con sus raíces fueron removidas del suelo, se eliminó el exceso de suelo con agua de la llave, posteriormente se enjuagaron con agua destilada, se cortaron las raíces y se incubaron en etanol al 96% toda la noche, se descartó el etanol y se lavaron las raíces con agua destilada. Luego, se incubaron durante una noche en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 %, luego se decantó el KOH y se enjuagaron las raíces con agua destilada. después, se

transfirieron las raíces a un tubo de 2 ml y cubrieron con la solución de tinción compuesta por WGA-Alexa Fluor (Invitrogen, W11261) y yoduro de propidio (Chayman Chemical 10008351). Bajo condiciones de oscuridad y en un desecador se aplicaron tres rondas de dos minutos de vacío cada 15 minutos. Finalmente, las raíces se colocaron en un cubreobjetos y se observaron bajo el microscopio confocal Olympus FV1000 teniendo en cuenta las longitudes de onda de WGA-Alexa Fluor y yoduro de propidio.

2.6 Análisis de la resistencia de *F. oxysporum* a fungicidas

Los fungicidas utilizados en este experimento fueron elegidos de acuerdo con la literatura, y la utilización de fungicidas por los productores para el tratamiento de la marchitez vascular causada por *Fusarium* spp. y *F. oxysporum* (Tabla 3). También, se incluyeron fungicidas usados actualmente para el control de la marchitez vascular de la zarzamora (Tabla 4). Las concentraciones evaluadas fueron elegidas de acuerdo con las concentraciones sugeridas para la aplicación en campo de cada fungicida (Tabla 3 y 4).

Este procedimiento se realizó utilizando cuatro diferentes tratamientos: 1) Medio mínimo con fungicida, 2) Medio mínimo sin sacarosa y con fungicida, 3) Medio mínimo (control), y 4) Medio mínimo sin sacarosa (control). Básicamente, se colocó un tapón de 5 mm de micelio de cada aislado fúngico en el centro de la caja de Petri de 50mm de diámetro, y se incubaron a una temperatura de 25 °C hasta que los hongos en los tratamientos control colonizaron todo el medio de cultivo en la caja de Petri. Se tomaron medidas del crecimiento radial cada 24 horas por cinco días en cuatro puntos de las colonias fúngicas. Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la formula propuesta por Vincent en 1947:

$$\%I = \left(\frac{RC - RP}{RC} \right) * 100 \quad (1)$$

De donde:

%I= Porcentaje de inhibición

RC: Crecimiento radial de *F. oxysporum* en placas control

RP: Crecimiento radial de *F. oxysporum* creciendo en medio envenenado

De acuerdo con esta fórmula se trabajó con el porcentaje de tolerancia que está dado por:

$$\% \text{ Tolerancia} = 100 - \% \text{ inhibición} \quad (2)$$

Tabla 3. Fungicidas usados

Fungicida	Ingrediente activo	Marca	Concentración (mg/L)	Referencia
Manzate	Mancozeb	Manzate 200	300	Zárate et al., 2021
Captan 50	Captan	Captan 50	500	Zárate et al., 2021
Tiabendazol	Tiabendazol	Tecto 60	5	Zárate et al., 2021 Martinez et al., 2021
Proud 3	Aceite de tomillo	Humagro	100	Bio Humanetics 2020
Switch	Cyprodinil-Fludioxonil	Switch 62.5 WG	100	Syngenta 2024
Derosal	Carbendazim	Derosal	100	Bashir et al., 2017
Cabrio C	Boscalid Pyraclostrobin	Cabrio C	5	Muhammad et al ., 2011
Dodina	Dodina	Syllit Flow	378	Datos no publicados
Procure	Triflumizole	Procure 480 SC	348	Valent 2025
Super Fosfito de Potasio Orgánico	Fosfito de potasio	Supercosecha-Fertiorgánicos	48000	Acosta-González et al., 2022
FubAgro	Extractos vegetales	Fubagro	1000	Agroorgánicos nacionales 2025

Tabla 4. Fungicidas actualmente usados por los productores para el control de la marchitez de zarzamora causada por *F. oxysporum* f. sp. *mori*

Fungicida	Ingrediente activo	Marca	Concentración (mg/L)	Referencia
Jabalí	Fosetil-al 80%	Jabalí	6000,0	Bayer, sf
Amistar	Azoxistrobin al 50 %	Amistar	200,0	Acosta-González et al., 2022
Tokat 240 ce	Metalaxil 25.30%	Tokat 240 ce	4,7	Taleb-Hossenkhan y Ibrahim., 2015
Extracto de Gobernadora	Extracto de <i>Larrea tridentata</i> 100%	Vitaextrae	500,0	Moreno 2011

2.7 Cuantificación relativa de la cantidad de ingrediente activo del fungicida

Metalaxil absorbido/adsorbido por *F. oxysporum*

De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis de resistencia a fungicidas, para la cuantificación de la cantidad de ingrediente activo absorbido o adsorbido por *F. oxysporum* se seleccionó el fungicida Tokat 240 ce (metalaxil), el cual es actualmente usado para el control de *F. oxysporum* f. sp. *mori* y es uno de los fungicidas al cual los aislados fúngicos presentaron alta resistencia. Al igual que en los experimentos de infección y virulencia, en este experimento se usaron los aislados Fo1, Fo3, Fo7 y GL1804.

2.7.1 Curva de crecimiento de *F. oxysporum*

Se inocularon 1×10^6 conidios/ml del hongo en 50 ml de medio líquido mínimo de sales de Vogel (anexo A). Los cultivos se incubaron a 28 °C a 150 rpm. La obtención de biomasa se realizó mediante filtración con un embudo y fibra sintética estéril cada 24 horas durante seis días. Posteriormente, fue congelada a -20°C por 48 horas para luego obtener la proteína total mediante el método descrito por Bridge et al., 2004 con algunas modificaciones. Primero, se colectó la biomasa mediante filtración. Posteriormente, se lavó dos veces la biomasa con 15 ml agua desionizada estéril, y almacenó a -20°C hasta su uso. Después, en un mortero estéril y frío se pulverizó la biomasa con la ayuda nitrógeno líquido, para luego resuspenderla en 1 ml de solución Tris-glicina pH 8.3. que contiene 3 g Trizma (Sigma, Poole, UK), 14.4 g glicina (Invitrogen, 0797C510), 1 L de agua desionizada. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 4°C a 12500 g durante 40 minutos y se pasó el sobrenadante a un tubo falcón estéril. Para una mejor cuantificación de la proteína total, se realizaron diluciones de 1 a 10 en la solución Tris-glicina y mediante un nanodrop (Thermo Scientific) se determinó la absorbancia de la muestra, dato usado para el cálculo de proteína total. Para esta determinación, se prepararon diluciones del estándar albumina sérica bovina BSA (Thermo Scientific, 23225) .

2.7.2 Obtención de muestra para la determinación de la concentración de metalaxil en la biomasa fúngica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se inoculo 1×10^6 conidios/ml de cada aislado de *F. oxysporum* en 50 ml de medio mínimo líquido adicionado con el fungicida Tokat 240 ce (metalaxil), así como al de medio mínimo líquido sin fungicida como control. Los cultivos se colocaron en agitación constante a 130 rpm y 28°C durante 72 horas. Después del crecimiento del hongo, se obtuvo la biomasa mediante filtración con la ayuda de fibra sintética estéril. La biomasa fue lavada y las soluciones resultantes de los lavados, así como los sobrenadantes fueron también colectados y enviados para la determinación del metalaxil ingrediente activo del fungicida Tokat 240 ce mediante HPLC.

2.8 Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado con sus respectivas replicas biológicas. Para conocer la normalización de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, luego, Se realizaron diversos análisis de varianza unifactorial y bifactorial (ANOVA), seguido de un análisis post-hoc mediante la prueba de Tukey, utilizando el programa GraphPad Prism 8.0. Los resultados fueron presentados en tablas o graficados en histogramas o mapas de calor indicando en donde corresponda las diferencias significativas.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Características morfológicas de *F. oxysporum*

Los aislados estudiados presentaron colonias algodonosas, de color blanco que se tornaban color violeta con el pasar del tiempo de incubación. Se observaron macroconidias ligeramente curvadas con dos septos (Figura 3B) y microconidias sin septos y de forma oval (Figura 3C)

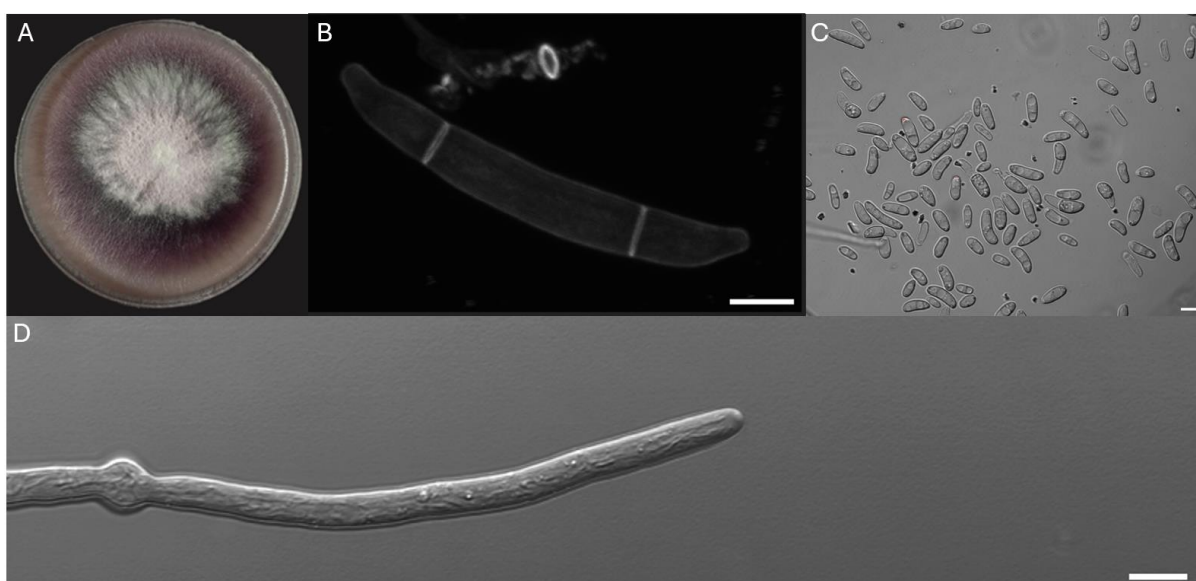


Figura 3. Características morfológicas de *F. oxysporum*. A. Crecimiento micelial en PDA. B. Macroconidia en agar CLA. C. Microconidia en agar CLA. D Hifa. B, C, D están a una escala de 5 μ m, fotografías tomadas en microscopio Olympus V1000.

3.2 Infección de plantas de zarzamora con *F. oxysporum* y cuantificación de la virulencia.

Después de 75 días de la infección las plantas presentaron síntomas como necrosis, clorosis, defoliación y marchitamiento (Figura 4). La cuantificación de la virulencia de los aislados de *F. oxysporum* en plantas de zarzamora. se presenta en la Figura 5. Nótese que el Fo1 se mostró más virulento que el resto de los aislados. Los aislados Fo3 y Fo7 muestran niveles de virulencia similares, pero diferentes a los índices de

virulencia mostrados por los aislados Fo1 y GL1804. Todos los datos obtenidos y sin procesar están mostrados en el Anexo B.



Figura 4. Plantas infectadas con *F. oxysporum*. A. Control. B. Fo1. C. Fo3. D. Fo7. E. GL1804

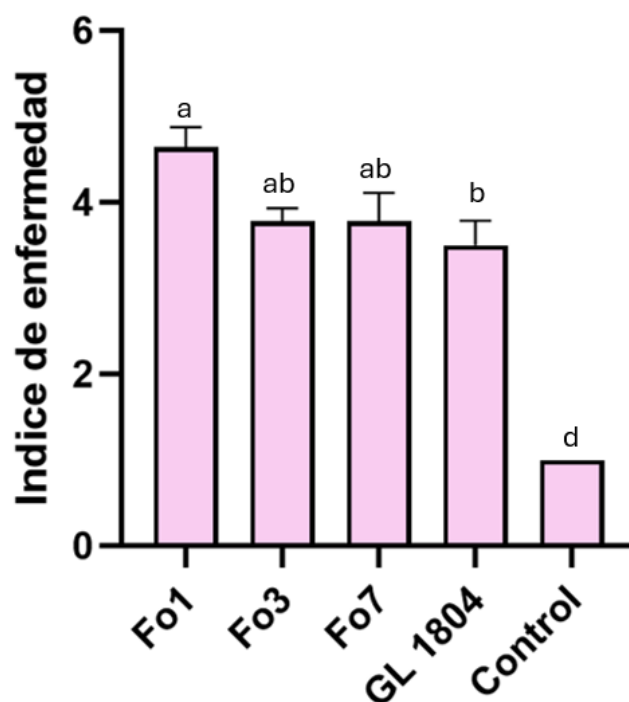


Figura 5. Cuantificación de la virulencia causada por los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *mori* en plantas de zarzamora. Diferentes letras sobre cada barra representan diferencias significativas.

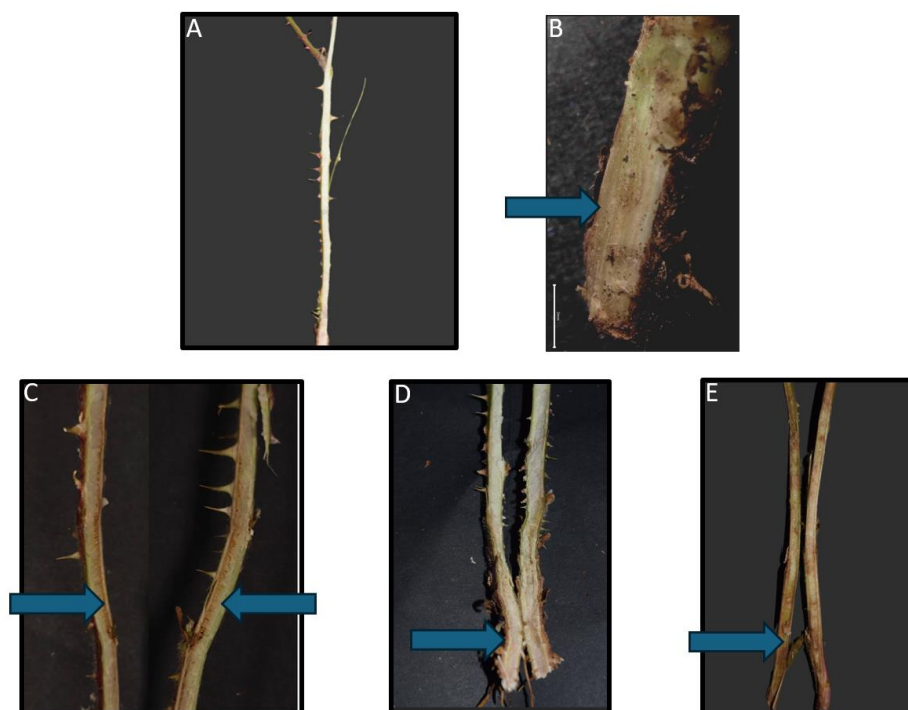


Figura 6. Imágenes representativas de los síntomas observados en los tallos de las plantas inoculadas con los diferentes aislados de *F. oxysporum* f. sp. *mori*. A. Control. B. Fo1. Imagen tomada con el estereoscopio a una escala de 2 mm. C. Fo3. D. Fo7. E. GL1804. La flecha azul muestra las franjas color café y tonalidades oscuras propias de la sintomatología causada por *F. oxysporum*.

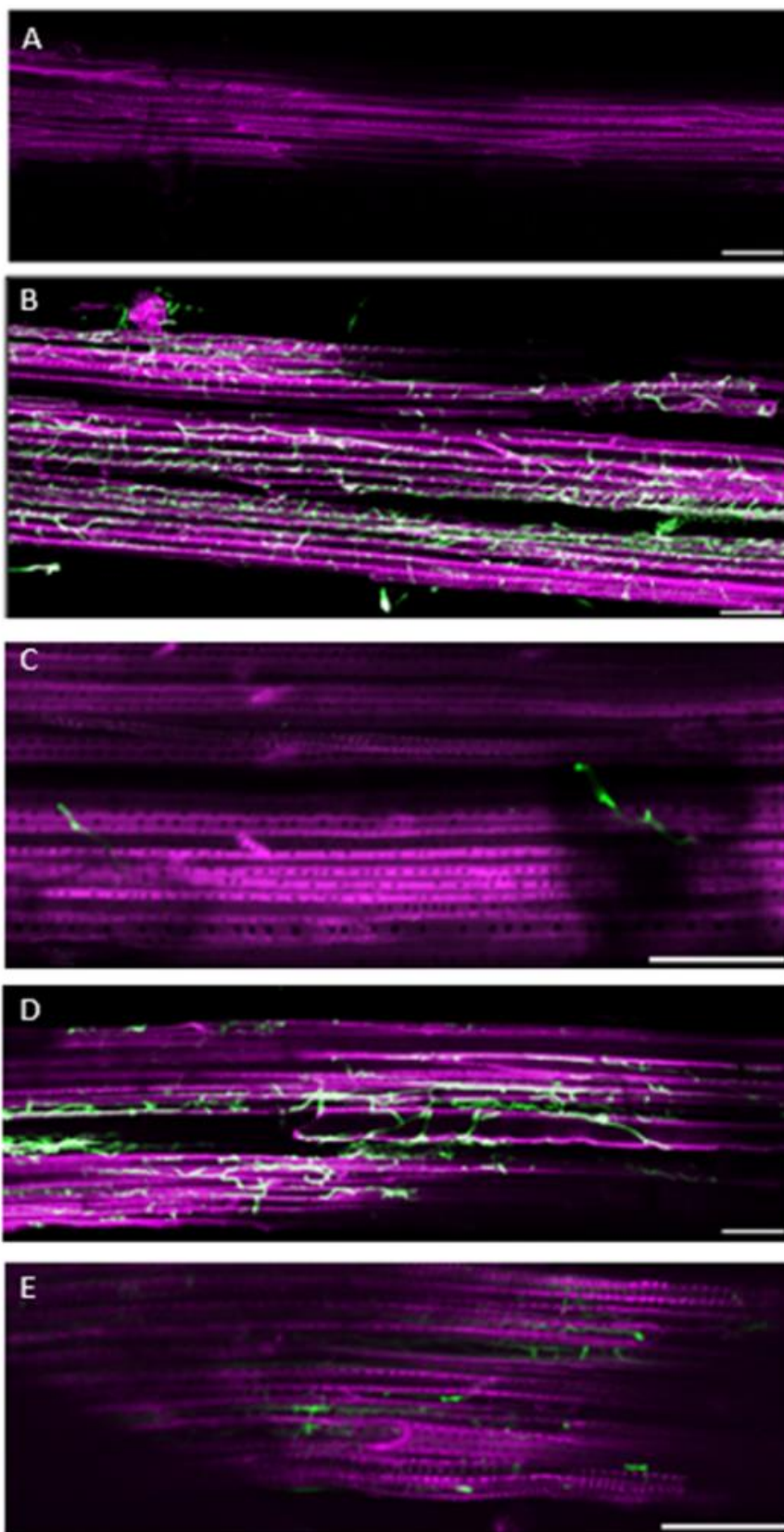


Figura 7. Colonización de *F. oxysporum* en las raíces de las plantas. Estructuras del hongo son mostradas en verde y tejido de la raíz de la planta en magenta. A. Control B.F.o1 C. Fo3. D. Fo7. E. GL1804. Todas las fotos fueron tomadas con el mismo objetivo y a una escala de 50 μ m

Los tallos de las plantas infectadas mostraron flacidez y franjas color café. En el interior mostraban síntomas de pudrición con áreas color marrón (Figura 6B -6E). Se observó una mayor intensidad de color café en el tallo de Fo3 (Figura 6C). Nótese que los tallos de las plantas control no mostraban la sintomatología anteriormente descrita (Figura 6A).

Todos los aislados estudiados colonizaron la raíz de la planta. Después de 75 días de infección, se observó presencia de los hongos colonizando los tejidos radiculares y en el xilema de las raíces de las plantas infectadas (Figura 7B-7E). Sin embargo, en las plantas control (Figura 7A) no se observó presencia del hongo en las raíces

3.3 Análisis de la resistencia de *F. oxysporum* a fungicidas

Los promedios de las mediciones del crecimiento a los cinco días posinoculación de los diferentes aislados fúngicos en los diferentes tratamientos con fungicidas son registrados en el Anexo C. El mayor crecimiento de las colonias fúngicas fue registradas al usar los fungicidas Proud, Manzate, Jabalí y Tokat 240 tanto en medios con y sin sacarosa. Se observó una mayor tolerancia de los aislados fúngicos a los fungicidas Proud, Manzate, Jabalí y Tokat 240 ce; y una menor tolerancia a los fungicidas extracto de gobernadora, Fubagro, Tecto 60, Derosal, Cabrio-C, Procure (Tabla 7). Los porcentajes de tolerancia de los aislados fúngicos a los diferentes tratamientos empleados, muestran que los fungicidas más efectivos para el control in vitro de los *F. oxysporum* fueron el extracto de *L. tridentata*, carbendazim, trifumizol y extractos vegetales. En cambio, los mayores porcentajes de tolerancia de los hongos fueron observados en al aceite de tomillo, mancozeb, metalaxil, azoxistrobin y fosetil-al tanto en medio con y sin sacarosa (Figura 8 y 9). Los fungicidas Jabalí, Tokat 240 ce, Amistar y extracto de gobernadora son actualmente usados para el control de *Fusarium* por los productores de zarzamora.

Al realizar un ANOVA de doble vía mediante el programa GraphPad Prism 8.0, se evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los aislados de U.S.A y México ante los fungicidas Fubagro (Extractos vegetales), y fosfito de potasio (Anexo D). Los aislados de U.S.A mostraron una mayor tolerancia a los fungicidas Fubagro (extractos vegetales), tiabendazol y fosfito de potasio en medio con sacarosa y envenenado con fungicidas, esto al compararlos con los aislados procedentes de México. Por otra parte, hay una mayor tolerancia por parte de los aislados mexicanos a los fungicidas Switch, Captan, Cabrio-C, Amistar y Manzate (Figura 8).

Tabla 7. Fungicidas, mecanismos de acción y tolerancia

Fungicida	Ingrediente Activo	Concentración mg/L	Mecanismo de Acción	Tolerancia con sacarosa	Tolerancia sin sacarosa
Manzate	Mancozeb	300	Induce inhibición enzimática múltiple, inhibe respiración	++++	++++
Captan 50	Captan	500	Interfiere en el mecanismo de respiración	+++	+++
Tecto 60	Tiabendazol	5	Inhibe mitosis y división celular	+	+
Proud 3	Aceite de tomillo	100	Descompone las membranas celulares	++++	++++
Switch	Cyprodinil-Fludioxonil	100	Inhibe la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo germinativo	++	+++
Derosal	Carbendazim	100	Inhibe mitosis y división celular	+	+
Cabrio C	Boscalid Pyraclostrobin	5	Inhibe la respiración	++	+++
Syllit Flow	Dodina	378	Interfiere con la respiración	+	+
Procure	Triflumizole	348	Interfiere con la síntesis del ergosterol	+	+
Super Fosfito Potasio Orgánico	Fosfito de potasio	48000	Modifica expresión de genes que codifican síntesis de proteínas	+++	++++
FubAgro	Extractos vegetales (extracto de gobernadora, extracto de pino, extracto de ácido cítrico)	1000	Desintegra las paredes celulares del patógeno	+	+
Jabalí	Fosetil-al 80%	6000	Interfiere con el mecanismo energético	+++	+++
Amistar	Azoxistrobin 50 %	200	Inhibe la respiración mitocondrial	++++	++++
Tokat 240 ce	Metalaxil 25.30%	4,7	interfiere en la síntesis del ARN ribosómico	++++	++++
Extracto de Gobernadora	Extracto de <i>Larrea tridentata</i>	500	Interfiere con la cadena transportadora de electrones	-	-

+ Menos tolerancia, ++++ más tolerancia

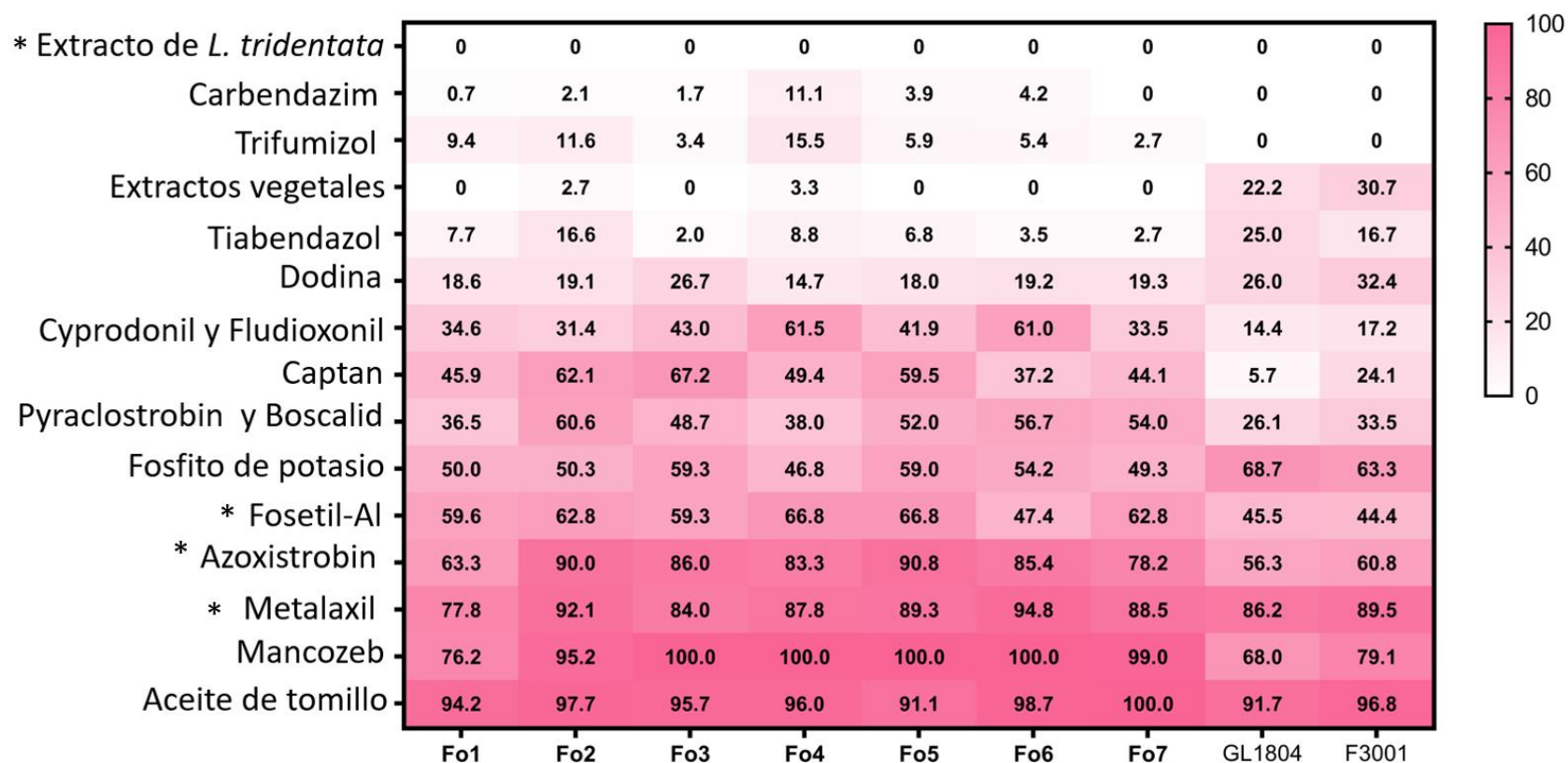


Figura 8. Mapa de calor mostrando los porcentajes de tolerancia de los hongos a los fungicidas en medio de cultivo con sacarosa.*Fungicidas usados por los productores de zarzamora para el control de *F. oxysporum*

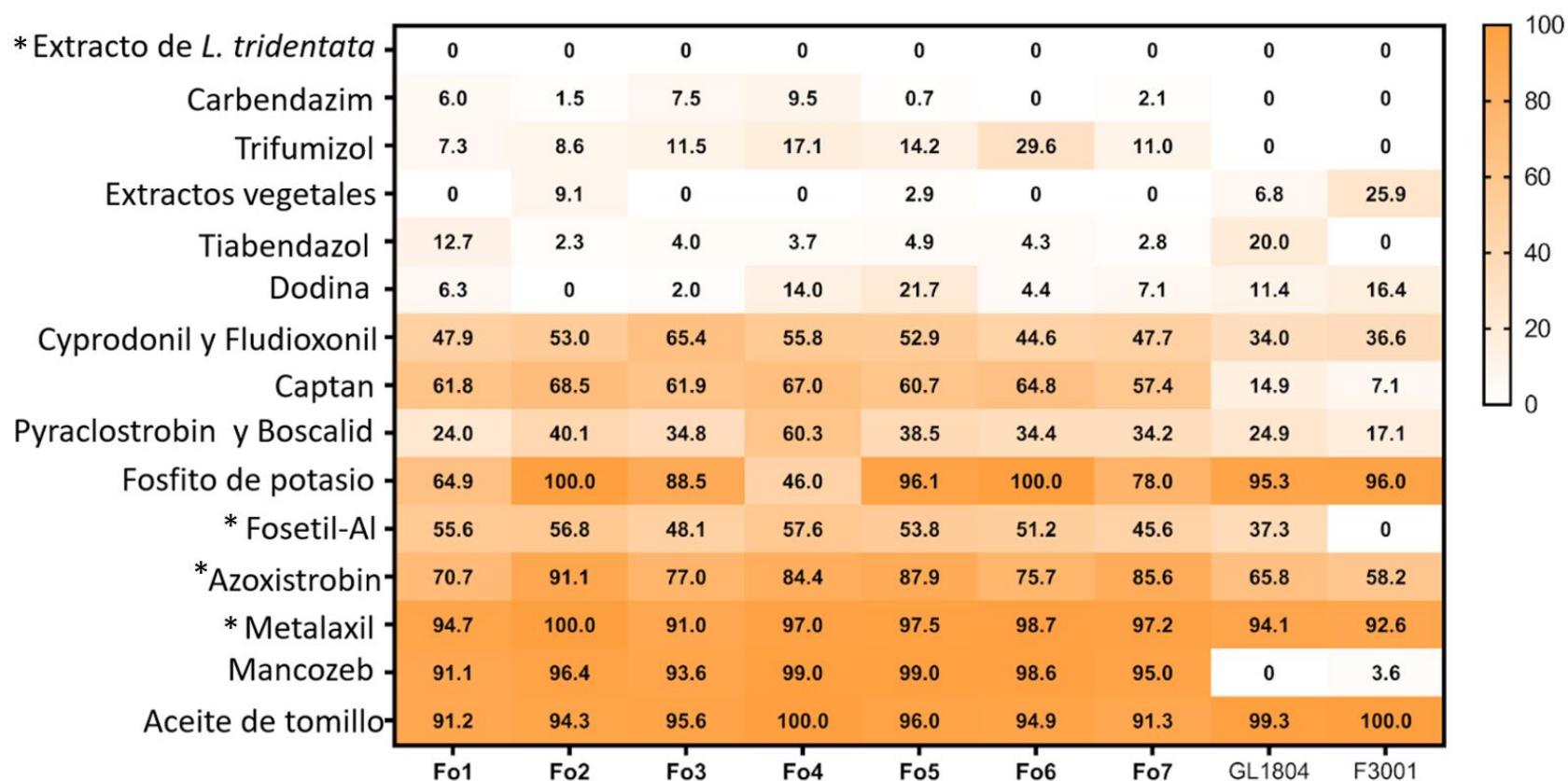


Figura 9. Mapa de calor mostrando los porcentajes de tolerancia de los hongos a los fungicidas en medio de cultivo sin sacarosa. *Fungicidas usados por los productores de zarzamora para el control de *F. oxysporum*

Para el tratamiento “medio envenenado con fungicidas y sin sacarosa” se evidenció que los aislados procedentes de U.S.A. Presentaron una mayor tolerancia a los extractos vegetales y tiabendazol, en comparación con los aislados procedentes de México. Mientras que estos últimos presentaron una mayor tolerancia al captan, fosetil-al, mancozeb, metalaxil, azoxistrobin y fosfito de potasio. No se observó tolerancia por parte de ninguno de los aislados al extracto de *L. tridentata*, y poca tolerancia al carbendazim, trifumizol, extractos vegetales, tiabendazol y dodina. En general todos los aislados fueron tolerantes al aceite de tomillo, metalaxil y azoxistrobin. Interesantemente, se registraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los aislados procedentes de México (Fo1 a Fo7) y los de U.S.A. (GL1804, F3001) a los extractos vegetales, tiabendazol, azoxistrobin, mancozeb y captan (anexo E). A continuación, se describen como lucían las colonias crecidas los tratamientos control con y sin sacarosa, así como en dos de los diferentes fungicidas usados, Jabalí y Tokat 240 ce. Se observó un mayor crecimiento de los aislados fúngicos que en el tratamiento de medio mínimo con sacarosa más Jabalí, que en el tratamiento de medio mínimo sin sacarosa más Jabalí (figura 10).

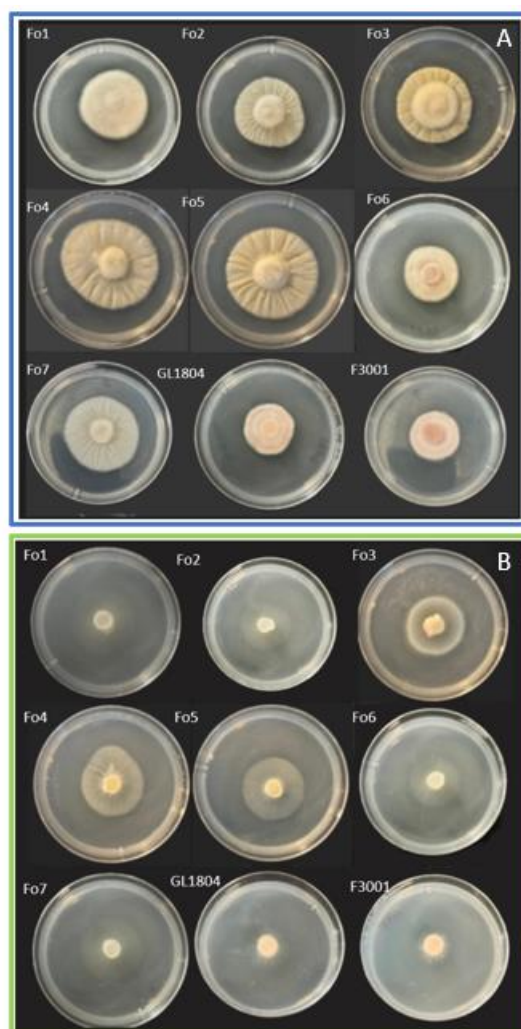


Figura 10. Imágenes representativas de las colonias en medio mínimo con Jabalí (fosetil al). A. Con sacarosa. B. Sin Sacarosa. Fo1 a Fo7 (aislados procedentes de México), GL1804 y F3001 (aislados procedentes de U.S.A)

Se observó un crecimiento similar de los aislados fúngicos en las condiciones control y el medio mínimo con sacarosa y envenenado con el fungicida metalaxil. Sin embargo, en medio mínimo sin sacarosa y envenenado con metalaxil, se muestran cambios en la morfología de la colonia, observándose un micelio más traslucido (Figura 11)

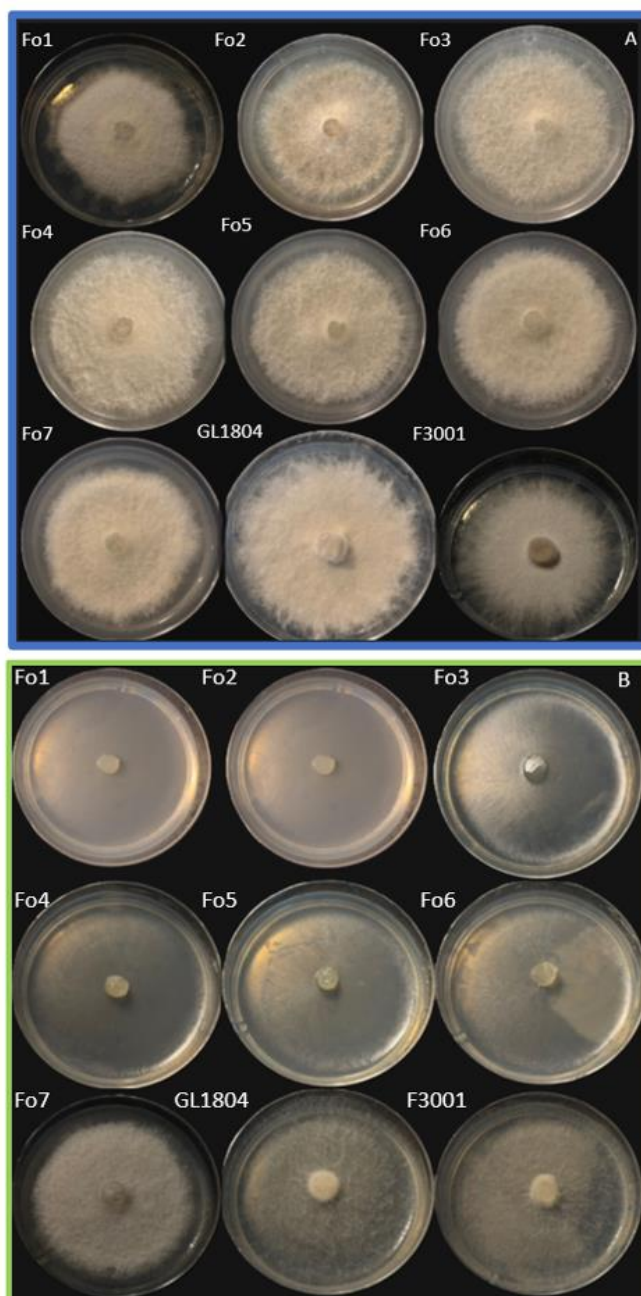


Figura 11 Imágenes representativas de colonias en medio mínimo con Tokat 240 ce (metalaxil). A. Con Sacarosa. B. Sin Sacarosa. Fo1 a Fo7 (aislados procedentes de México), GL1804 y F3001 (aislados procedentes de U.S.A)

En general, se observa que los aislados GL1804 y F3001 tienen un crecimiento radial menor comparado con el resto de aislados en la condición con sacarosa y sin sacarosa para los fungicidas cyprodonil y fludioxonil, captan, pyraclostrobin y boscalid, fosetil-al, azoxistrobin, mancozeb, aceite de tomillo, trifumizol, carbendazim y metalaxil. También se observó en la condición control de medio mínimo con sacarosa y sin fungicidas, los hongos mostraron crecimiento algodonoso y color blanquecino. Sin embargo, en el control de medio sin sacarosa los aislados fúngicos crecieron con micelio hialino y tenue, aunque la medida en centímetros del crecimiento de la colonia es similar en ambos controles, con y sin azúcar (Figura 12).

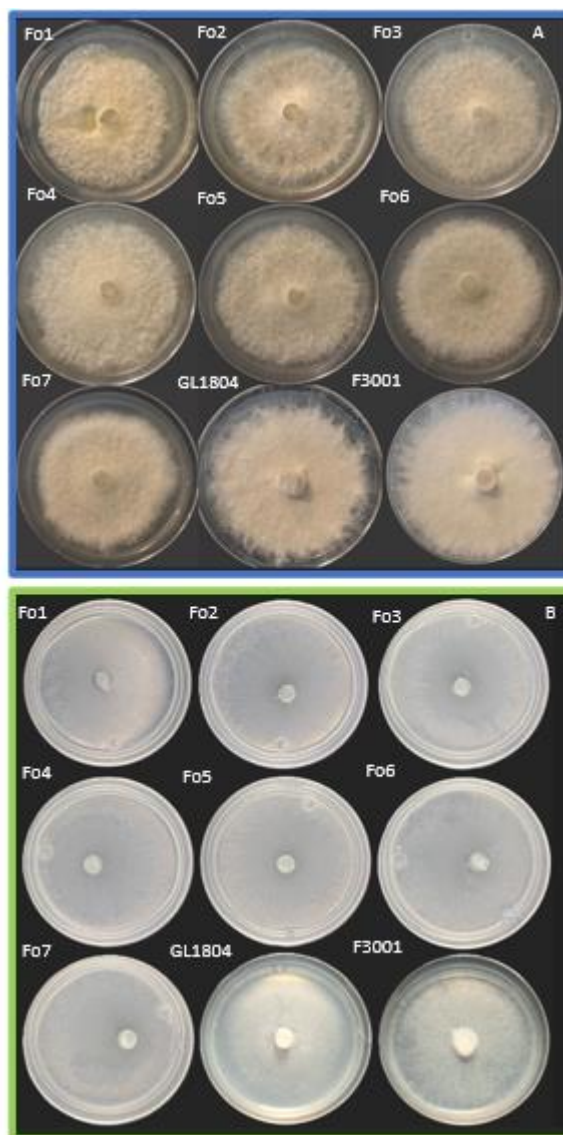


Figura 12. . Imágenes representativas de colonias control, medio minino sin fungicida. A. Con sacarosa. B. Sin sacarosa. Fo1 a Fo7 (aislados procedentes de México), GL1804 y F3001 (aislados procedentes de U.S.A)

3.4 Curva de Crecimiento *F. oxysporum*

Con la cuantificación de la proteína total como indicativo del crecimiento del aislado Fo3 a diferentes intervalos de tiempo, se realizó la curva de crecimiento (Figura 13). Los datos obtenidos se registran en el anexo F. Los aislados Fo1 y GL 1804 mostraron un crecimiento similar al aislado Fo3. De acuerdo con la curva de crecimiento para el aislado Fo3, se determinó tomar muestras a las 72 horas, tiempo en el que se observó la fase estacionaria en el crecimiento del hongo.

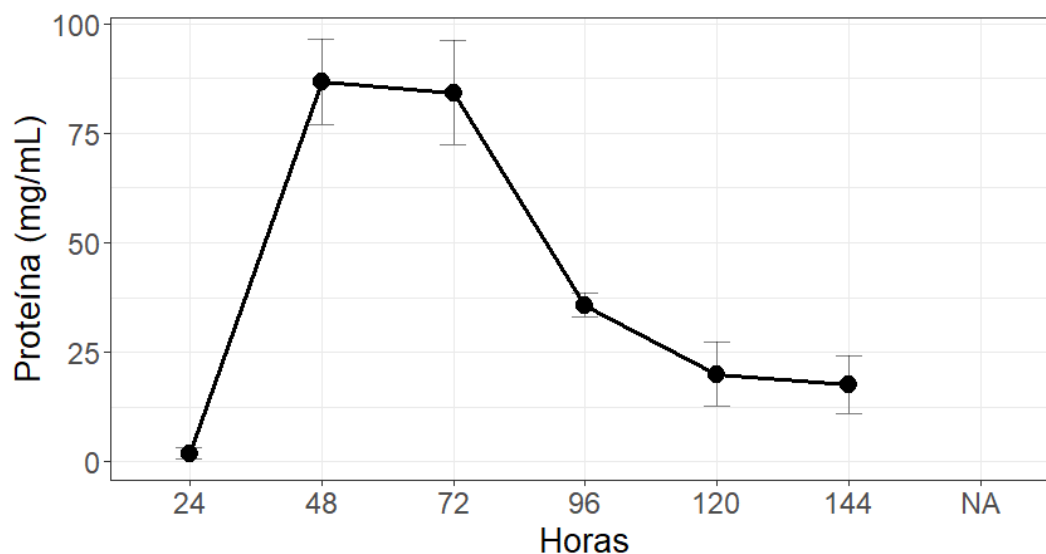


Figura 13. Curva de crecimiento *F. oxysporum* 3

3.5 Determinación de la concentración de Metalaxil en donde se observó una mayor producción de biomasa fúngica

Se probaron diferentes concentraciones de metalaxil en el medio para determinar la concentración de fungicida en donde se observaba una mayor producción de biomasa fúngica. Para los aislados Fo3 y Fo7 se observó una mayor cantidad de biomasa en las concentraciones de 100 y 200 mg/L de metalaxil en el medio mínimo líquido. Sin embargo, para el aislado GL1804, se observó una mayor producción de biomasa a una concentración de 100 mg/L de metalaxil. El experimento número seis corresponde al crecimiento de los aislados en medio mínimo sin metalaxil (control). Se trabajó con una solución stock de 5mg/mL de metalaxil.

Tabla 11. Determinación de la concentración de metalaxil en relación con la biomasa fúngica

Aislado	Experimento	Concentración fungicida (mg/L)	Peso (g)
Fo3	1	100	1.26
	2	200	1.04
	3	300	0.05
	4	400	0.28
	5	500	0.45
	6	0	0.32
Fo7	1	100	0.12
	2	200	0.63
	3	300	0.06
	4	400	0.02
	5	500	0.04
	6	0	0.06
GL1804	1	100	1.6
	2	200	1.8
	3	300	1.6
	4	400	1.5
	5	500	1.6
	6	0	1.8

3.6 Obtención de la muestra para determinación de la cantidad de Metalaxil en la biomasa de los hongos mediante HPLC.

Se realizaron cinco réplicas para cada hongo con el fungicida metalaxil, así como para los controles (crecimiento de los hongos sin metalaxil). Se obtuvieron los pesos de la biomasa fresca y después de su liofilización. Para asegurar que se envío la cantidad suficiente de muestra para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los datos obtenidos se relacionan en la tabla 14. Se obtuvieron pesos similares de biomasa para todos los aislados fúngicos en los tratamientos con o sin él fungicida metalaxil, lo que puede ser por la resistencia que este hongo muestra al metalaxil.

Tabla 12. Obtención biomasa fúngica para determinación del metalaxil mediante HPLC

Aislado	Replica	Peso húmedo (g)	Peso liofilizado
Fo1 en medio mínimo con 100 mg/ml de metalaxil	1	2.10	0.12
	2	2.17	0.11
	3	2.12	0.13
	4	2.16	0.15
	5	2.06	0.15
Fo1 en medio mínimo sin metalaxil (control)	1	2.14	0.12
	2	2.18	0.14
	3	2.16	0.13
	4	2.24	0.14
	5	2.21	0.13
Fo3 en medio mínimo con 100 mg/ml de metalaxil	1	2.10	0.13
	2	2.00	0.09
	3	1.40	0.09
	4	2.10	0.11
	5	1.50	0.08
Fo3 en medio mínimo sin metalaxil (control)	1	1.70	0.14
	2	2.00	0.14
	3	1.90	0.13
	4	1.20	0.08
	5	1.60	0.12
Fo7 en medio mínimo con 100 mg/ml de metalaxil	1	0.80	0.03
	2	1.40	0.05
	3	1.60	0.09
	4	1.50	0.07
	5	1.50	0.07
Fo7 en medio mínimo sin metalaxil (control)	1	1.10	0.08
	2	1.30	0.08
	3	1.60	0.09
	4	1.70	0.09
	5	1.60	0.12
GL1804 en medio mínimo con 200 mg/ml de metalaxil	1	1.12	0.19
	2	1.99	0.20
	3	2.09	0.21
	4	2.09	0.15
	5	1.98	0.12
GL1804 en medio mínimo sin metalaxil (control)	1	2.30	0.20
	2	1.82	0.17
	3	1.70	0.16
	4	1.70	0.19
	5	1.56	0.14

Capítulo 4. Discusión

Fusarium oxysporum es un hongo fitopatógeno originalmente encontrado en el suelo que causa marchitez vascular en más de 100 especies de plantas, siendo una amenaza para cultivos de importancia agrícola como el plátano, los cereales, el tomate, entre otros (Huasini et al., 2018). En el 2007 y 2020 se registraron pérdidas de 3000 ha y 2500 ha por la marchitez vascular de la zarzamora causada por este hongo (Hernández Cruz et al., 2015, Rebollar y Silva., 2021, INIFAP 2022). Su control principalmente se ha basado en el uso de fungicidas químicos, orgánicos, biológicos y la rotación de cultivos (Campo, 2014). Sin embargo, estudios recientes recomiendan un mayor conocimiento del patógeno para generar cultivares resistentes a la colonización de *Fusarium* y buscar estrategias de control más efectivas (Rebollar y Silva 2021). Con el propósito de ampliar el conocimiento sobre características como la virulencia y la resistencia a fungicidas de aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* en México, en este proyecto se evaluaron dichos parámetros en siete aislados recolectados en distintos puntos de los municipios de Peribán y Los Reyes, en el estado de Michoacán. Estos municipios son los mayores productores de zarzamora a nivel nacional.

Después de realizar los análisis de virulencia, se observó que de las cepas Fo1, Fo3, Fo7 y GL1804; el menos virulento fue GL 1804 proveniente Santa Cruz en U.S.A, esto a pesar de haber sido previamente reportado como altamente virulento (Pastrana et al., 2017). Este aislado mostró ejercer en la planta un menor índice de enfermedad que los aislados Fo1, Fo3, y Fo7 provenientes del Estado de Michoacán, México. Pastrana y colaboradores en el 2017 reportaron que la cepa GL1804 causó la muerte de la planta de zarzamora en menos de 60 días, sin embargo, en este trabajo se observó que la cepa GL1804 causó síntomas importantes de infección (3.5 de índice de enfermedad) a los 75 días post-infección (dpi) pero sin causar la muerte de la planta. Según Kraft y colaboradores en 1978 la virulencia esta influenciada por diferentes variables como el método de inoculación, la edad de la planta y la temperatura. De igual forma Rebollar y Silva en el 2021 evidencian diferentes niveles de virulencia de los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *mori*, ya que, de 60 aislados, la mayoría mató a la planta en 43 días, sin embargo, algunos aislados causaron marchitez a los 25 días y otros a los 45 días. También están descritos en la literatura diversas proteínas conocidas como efectores que están en *Fusarium* spp y actúan como factores de virulencia tales como poligalacturonasas, proteasa aspártica, metaloproteasas, glucosa hidrolasa entre otras. De igual manera algunos metabolitos (tóxicas) producidos por el patógeno (Gutierrez-Sánchez et al., 2023).

Los aislados Fo3 y Fo7 presentaron el mismo nivel de virulencia mostrando un índice de enfermedad de 3.79, aunque estos aislados son diferentes y colectados de diferentes puntos de muestreo pueden tener el mismo genotipo, por lo tanto, su nivel de virulencia es muy similar. Interesantemente estos hongos fueron aislados en punto cercanos de muestreo y distantes del punto de muestreo donde se aisló el hongo Fo1 (Figura 1) el cual mostró en valor más alto en el índice de enfermedad, incluso significativamente mayor al índice de enfermedad cuantificado para la cepa GL1804 (Figura 5), sugiriendo una correlación entre los lugares de muestreo y los índices de virulencia. Rebollar y Silva en el 2021 presentan información de la influencia de los factores edáficos en la concentración de la marchitez vascular en la zarzamora en algunas áreas del valle del municipio de los Reyes.

En previos ensayos de infección en plantas de zarzamora variedad “Tupy” con aislados de *F. oxysporum* provenientes del municipio de Los Reyes Michoacán, se reportó la presencia de los primeros síntomas de la infección a los 60 dpi y la muerte de las plantas infectadas varios días después (Hernández-Cruz et al., 2020). Sin embargo, en este estudio trabajando con aislados del mismo municipio, solo el aislado Fo1 causó la muerte de la mayoría de las plantas (cinco plantas de 7) entre 23 y 27 días después de la infección. Interesantemente, todos los tallos de las plantas de zarzamora infectadas en este trabajo con los aislados Fo1, Fo3, Fo7 y GL 1804 mostraron flacidez y manchas color café en el interior (Figura 6), una sintomatología característica de la infección por *F. oxysporum* (Hernández Cruz et al., 2015)

Por otra parte, en los ensayos de resistencia a fungicidas en el tratamiento 1, que consistió en inocular los aislados en medio mínimo con fungicidas, se observó que todos los hongos mostraron sensibilidad a el extracto de gobernadora (Vitaextrae) cuyo componente principal es el ácido nordihidroguayarático (NDGA). Estos resultados son similares a los encontrados por Moreno y colaboradores en el 2011 cuando a concentraciones de 300 y 500 ppm de NDGA no se observó crecimiento de las colonias de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. También, los aislados de *F. oxysporum* estudiados en este trabajo presentaron poca resistencia a los fungicidas extractos vegetales (extracto de gobernadora, extracto de pino, extracto de ácido cítrico), carbendazim, tiabendazol, triflumizol y dodina. Los aislados de *F. oxysporum* provenientes de California mostraron un 20% más de tolerancia a los extractos vegetales (extracto de gobernadora, extracto de pino, extracto de ácido cítrico) que los aislados provenientes de Michoacán México. Los resultados de este proyecto concuerdan con los encontrados por Acosta y colaboradores en el 2022, donde tiabendazol y trifumizol resultaron ser unos de los fungicidas más efectivos contra *F. oxysporum*. Similarmente, Ortiz-Martínez y colaboradores en el 2021 reportan una tolerancia del 0 % de *F. incarnatum* al 5 mg/L de tiabendazol. Por otra parte, se observó una tolerancia del 0 al 5%, de *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori* al carbendazim, lo que concuerda con los datos mostrados por

Devkota y colaboradores en el 2021 quienes reportaron una tolerancia del 0% de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* a dicho fungicida. Similarmente, se observó que la mayoría de aislados de *F. oxysporum* reportados en este trabajo mostraron poca tolerancia, entre el 14 y 41%, al fungicida Switch (cyprodonil y fludioxonil), lo que concuerda con Pérez-Rodríguez y colaboradores quienes en el 2019 reportaron al fungicida switch como efectivo en contra de *Fusarium* sp.

La mayoría de aislados fueron moderadamente resistentes al fosetil-al, captan, pyraclostrobin y boscalid y fosfito de potasio. Para el fosetil-al se observaron diferencias significativas en la tolerancia entre los aislados Fo1, Fo4, Fo5 procedentes de México con 59.6%, 66.8% y 66,8% de tolerancia respectivamente, en comparación con los aislados GL1804 y F3001 provenientes de los U.S.A, que mostraron 45.5% y 44.4% de tolerancia respectivamente. Shukla et al en el 2024 mostraron porcentajes de tolerancia entre el 33% y el 50% para diferentes razas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* con concentraciones de 150 ppm de fosetil-al. Sin embargo, en este proyecto considerando las concentraciones de este fungicida utilizados en campo (Bayer, sf), se utilizaron concentraciones de 6000 ppm del mismo fungicida, observándose porcentajes de tolerancia entre el 44.5 y el 66.8%, lo que indica una mayor resistencia por parte de los aislados fúngicos estudiados en este proyecto.

Zarate-Ramos et al en el 2021 reportaron una tolerancia del 2.2% en *Fusarium incarnatum* a 200 ppm de fungicida captan. Sin embargo, en este trabajo a concentración de 5 ppm se observaron porcentajes de tolerancia entre 37,2% y 67,12 % en la mayoría de aislados procedentes de México. También, Zarate-Ramos y colaboradores en el 2021 reportaron 100 % de inhibición a 300 ppm del fungicida mancozeb, pero contrariamente en este trabajo se observó que la mayoría de aislados presentaron tolerancia a este fungicida (Figura 8).

Para el fosfito de potasio, se observó entre 50 y 70 % de tolerancia de los aislados de *F. oxysporum*, los cuales fueron similares a lo reportado por Acosta y colaboradores en el 2022, quienes reportaron que los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *mori* eran resistentes a este fungicida. En medio envenenado con fosfito de potasio y sin sacarosa se observaron porcentajes de tolerancia superiores al 60 % en la mayoría de los aislados. Incluso, el aislado Fo2 mostró un mayor crecimiento en el medio envenenado que en el control (medio sin fungicida), lo que podría sugerir que *Fusarium* está utilizando los compuestos de carbono y nitrógeno presentes en el fosfito de potasio para su crecimiento.

Todos los aislados estudiados presentaron resistencia a los fungicidas mancozeb, metalaxil y aceite de tomillo. Los resultados obtenidos para el mancozeb, un fungicida multisitio según el FRAC, difieren de los

reportados por Zarate et al en el 2021, donde el mancozeb resulto ser efectivo en condiciones *in vitro* en la inhibición de *F. incarnatum*, el cual mostró solo 7 % de tolerancia al fungicida. Según Thind, y Hollomon 2018, no han sido reportados casos de resistencia a los ditiocarbamatos compuesto químico presente en el fungicida mancozeb. Sin embargo, Bhaskar y colaboradores en el 2023 reportaron 50% de tolerancia a mancozeb en aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*.

Los resultados obtenidos muestran porcentajes de tolerancia superiores al 80 % al fungicida metalaxil. Estos difieren de los reportados por Mondragon-Flores y colaboradores en el 2022, quienes reportaron de 0 a 20 % de tolerancia en *Phytophthora cinnamomi*, aunque también hay algunos reportes sobre aislados de *Phytophthora infestans* resistentes al metalaxil (Taleb-Hossenkhani y Ibrahim 2015). El metalaxil se ha usado desde 1970 para el control de Oomycetos fitopatógenos (Matson et al., 2015). Para el control de *F. oxysporum*, este agroquímico se ha usado en combinación con otros fungicidas, mostrando efectos moderados en el control de la marchitez vascular causada por *Fusarium* (Ibrahim et al., 2023). Además, es importante resaltar que los Oomycetos y los hongos de género *Fusarium*, son dos grupos de microorganismos filogenéticamente muy distantes (Kamoun, 2003) y posiblemente esas diferencias evolutivas impactan en una respuesta y resistencia diferente al fungicida.

En general, todos los hongos mostraron una menor tolerancia en medio mínimo envenenado con fungicidas y sin sacarosa. Por ejemplo, se observó menor tolerancia de los hongos provenientes de U.S.A al Fosetil-al, al mancozeb, y al captan, en comparación con todos los aislados de Michoacán México. Pero también, se observó una mayor tolerancia de los aislados GL1804 y F3001 de U.S.A al Fubagro y al tiabendazol, en comparación a los aislados de México.

En este proyecto se logró encontrar los fungicidas efectivos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, así como aquellos a los que este hongo es resistente. Estos resultados servirán para futuros proyectos realizados en campo que permitirán encontrar estrategias integrales para el control de la marchitez vascular en zarzamora. También se encontró que los hongos de *F. oxysporum* aislados de plantas de zarzamora con síntomas de marchitez vascular en México, son altamente virulentos. Por ejemplo, el aislado Fo1 mostró índices de virulencia significativamente más altos que los mostrados por el *F. oxysporum* f. sp. *mori* previamente reportados y caracterizados como altamente virulento en los Estados Unidos.

Capítulo 5. Conclusiones

Se demostró que los *F. oxysporum* aislados de plantas de zarzamora con síntomas en Michoacán México, son más virulentos, bajo las condiciones probadas, que la cepa GL1804 aislada en California, U.S.A, catalogada como altamente virulenta. Se observó que el aislado Fo1 procedente de México, fue significativamente más virulento que el resto de los aislados y cepas utilizadas en los ensayos de infección.

El fungicida orgánico extracto de gobernadora en condiciones in vitro es 100% eficaz para el control de *F. oxysporum* f.sp. *mori* al inhibir completamente su crecimiento. Por lo cual, representa una potencial alternativa para el control de la marchitez vascular de la zarzamora. Sin embargo, se requieren estudios *in vivo* para corroborar este resultado en campo.

El fungicida Fubagro en condiciones de laboratorio mostró tener más de un 90% de efectividad contra *F. oxysporum* f. sp. *mori*, por lo cual se podría recomendar su uso para el control de la marchitez vascular de la zarzamora. Para validar este resultado, sería recomendable llevar a cabo estudios adicionales en campo.

Los fungicidas químicos tradicionales como el trifumizol, carbendazim, tiabendazol, dodina mostraron resultados positivos al inhibir en más de un 70% a *F. oxysporum* f. sp. *mori* en condiciones de laboratorio.

Los fungicidas metalaxil, aceite de tomillo y mancozeb fueron ineficaces en inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *mori* en condiciones de laboratorio. Por lo cual, se recomienda dejar de usarlos para controlar marchitez vascular de la zarzamora.

Los aislados mexicanos presentaron una mayor susceptibilidad a los fungicidas extracto de gobernadora, carbendazim, trifumizol, extractos vegetales, tiabendazol, dodina, cyprodonil y fludioxonil y una mayor tolerancia a los fungicidas aceite de tomillo, mancozeb, metalaxil, azoxistrobin.

Se obtuvo la biomasa, el sobrenadante y la solución de lavado para los aislados Fo1, Fo3, Fo7 (100 mg/L), GL1804 (200mg/L) tratados con metalaxil en medio líquido. El metalaxil fue uno de los fungicidas al que la mayoría de aislados mostraron tolerancia, y que está actualmente siendo usado por los productores de zarzamora en México. Las muestras de este experimento están siendo analizadas por un servicio externo de metabolómica para determinar la cantidad de Metalaxil que es bioacumulado, bio-adsorbido o bio-absorbido por el hongo.

Capítulo 6. Recomendaciones

Es importante realizar estudios más detallados *mediante* técnicas de microscopia de la colonización *de F. oxysporum* f. *sp. mori* en las raíces de la planta de zarzamora.

Para conocer el origen de la resistencia que presentaron los diferentes aislados a algunos fungicidas es importante realizar estudios de transcriptómica y genómica del patosistema *de F. oxysporum* f. *sp. mori* zarzamora.

Con los datos obtenidos en este proyecto es necesario realizar estudios *invivo* que permitan tomar las medidas necesarias en campo para el control de la marchitez vascular de la zarzamora.

Literatura citada

- Acosta-González, U., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Hernandez-Castrejon, J., Romero-Bautista, A., & Rebollar-Alviter, A. (2022). Comparative performance of fungicides and biocontrol products in the management of Fusarium Wilt of Blackberry. *Plant Disease*, 106(5), 1419–1427. DOI: [10.1094/PDIS-08-21-1742-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1742-RE).
- Agrorgránicos Nacionales. (2025). FubAgro. Consultado el día 6 de enero de 2025. <https://www.agrorganicosnacionales.com/55-botanicos/190-fubagro>
- Akosah, Y.A., Kostennikova, Z.S., Lutfullin, M.T., Lutfullina, G.F., Afordoanyi, D.M., Vologin, S.G., & Mardanova, A.M. (2023). Induced expression of CYP51a and HK1 genes associated with Penconazole and Fludioxonil resistance in the potato pathogen *Fusarium oxysporum*. *Microorganisms*, 11(5), 1-12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051257>.
- Allen, T.W., Enebak, S.A., & Carey, W.A. (2004). Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed, *Crop Protection*, 23(10), 979-982. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.02.010>.
- Ayhan, D. H., Abbondante, S., Martínez-Soto, D., Wu, S., Rodríguez-Vargas, R., Milo, S., Rickelton, K., Sohrab, V., Kotera, S., Arie, T., Marshall, M. E., Rocha, M. C., Haridas, S., Grigoriev, I. V., Shlezinger, N., Pearlman, E., & Ma, L. J. (2025). Virulence of *Fusarium oxysporum* strains causing corneal or plant disease is associated with their distinct accessory chromosomes. *BioRxiv*. 1-50. <https://doi.org/10.1101/2024.05.23.595639>.
- Bashir, S., Mughal, M. N., Dar, S. A., Nissa, S. U., Hakeem, S., Wani, R., Baba, J. A., & Habib, M. (2017). In vitro efficacy of Fungicides and Bio-Control Agents against wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *ciceris* (FOC). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 1392-1399. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.166>.
- Bashir, M. R., Atiq, M., Sajid, M., Mohsan, M., Abbas, W., Alam, M. W., & Bashair, M. (2018). Antifungal exploitation of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* causing Fusarium wilt of chilli pepper in Pakistan. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1197–1205. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1032-9>.
- Bhaskar-Pimpale, K., Suryawanshi, J.S., Deokar, C.D., Bonsade, K.A. (2023). In-vitro evaluation of different fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*. *The Pharma Innovation Journal* 2023; 12(2), 2935-2938. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2023/vol12issue2/PartAJ/12-2-489-323.pdf>.
- Bayer CropScience Inc. (s. f.). Aliette® WG. Consultado el día 6 de enero. De 2025. https://preview1.assetsadobe.com/is/content/bayer/ALIETTE_WG_Labelpdf
- Campo-Arana, R., Pineda, B., Varon, F., Sarria-Villa, G.A., Prado, G., Zambolin, L., Zapata, M., Villareal, N.E., & Rey, V. (2014). *Manejo de enfermedades en cultivos tropicales*. Campo Arana R.O. DOI: [10.13140/RG.2.2.22848.76801](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22848.76801)
- Cancino-Escalante, G.O., Montaña-Sánchez, L.R., Quevedo-García, E., & Díaz-Carvajal, C. (2011). Caracterización fenotípica de accesiones de especies de *Rubus* L. de los municipios de Pamplona y Chitagá, región Nororiental de Colombia. *Universitas Scientiarum*, 16 (3), 219-233. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22848.76801>

[10.11144/javeriana.SC16-3.pcor.](https://doi.org/10.11144/javeriana.SC16-3.pcor.)

- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía y ambiente*, 37(1), 1-19. <https://www.researchgate.net/publication/322087525>.
- Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (FRAC). (2019). Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción. https://www.fmcagro.es/img/folleto_Clasificaci%C3%B3n%20de%20fungicidas%20y%20bactericidas%20seg%C3%BAn%20el%20modo%20de%20acci%C3%B3n.pdf
- Contreras-Pérez, M., Santoyo-Pizano, G., De Los Santos-Villalobos, S., Gutiérrez García, M. A., Del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Del Carmen Rocha Granados, M. (2019). Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *eubatus*) en el estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(3), 479-485. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1905-4>.
- Cosme, F., Pinto, T., Aires, A., Morais, M.C., Bacelar, E., Anjos, R., Ferreira-Cardoso, J., Oliveira, I., Vilela, A., & Gonçalves, B. (2022). Red fruits composition and their health benefits—A Review *Foods*, 11(5), 644-671. <https://doi.org/10.3390/foods11050644>.
- Clarck, J.R., Stafne, E. T., Hall, H. K., & Finn, C. E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Plant Breeding Reviews*, 29(19), 21-24. <https://doi.org/10.1002/9780470168035.ch2>.
- Chung, W.H., Chung, W.C., Ting, P.F., Ru, C.C., Huang, H.C., & Huang, J.W. (2009). Nature of resistance to methyl benzimidazole carbamate fungicides in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lilii* and *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* in Taiwan. *Journal of Phytopathology*, 157, 742–747. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01545.x>.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *In Molecular Plant Pathology*, 13 (4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Devkota, S., Poudel, P., Parajuli, T., & Bhatt, P. (2023). Evaluation of effectiveness of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* in laboratory. *Acta Scientific Agriculture*, 7(8), 35–38. <https://www.researchgate.net/publication/372823383>.
- Diaconeasa, Z., Florica, R., Rugină, D., Lucian, C., & Socaciu, C. (2014). HPLC/PDA–ESI/MS Identification of phenolic acids, flavonol glycosides and antioxidant potential in blueberry, blackberry, raspberries and cranberries. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2 (11), 781-785. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-11-4>.
- Shukla, D. N., Tiwari, P., Singh, S. K. & Tiwari, R. (2024). Efficacy of Novel Fungicides against the *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Causing Panama wilt of Banana. *International Journal of Plant & Soil Science*, 36(1), 188–198. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2024/v36i14349>
- Fisher, M. C., Gurr, S. J., Cuomo, C. A., Blehert, D. S., Jin, H., Stukenbrock, E. H., Stajich, J. E., Kahmann, R., Boone, C., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Klein, B. S., Kronstad, J. W., Sheppard, D. C., Taylor, J. W., Wright, G. D., Heitman, J., Casadevall, A., & Cowen, L. E. (2020). Threats posed by the fungal kingdom to humans, wildlife, and agriculture. *mBio*, 11(3), e00449-20.

<https://doi.org/10.1128/mBio.00449-20>.

- Frąc, M., Gryta, A., Oszust, K., & Kotowicz, N. (2016). Fast and accurate microplate method (Biolog MT2) for Detection of *Fusarium* fungicides resistance/sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 489. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00489>
- González, Y., Martínez-Soto, D., de los Santos-Villalobos, S. Garcia-Marin, L.E., Juarez-Moreno, K., & Castro-Longoria, E. (2024). Potential application of a fungal co-culture crude extract for the conservation of post-harvest fruits. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55, 1679–1691. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01274-5>.
- González-Oviedo, N. A., Iglesias Andreu, L. G., Flores-de la Rosa, F. R., Rivera-Fernández, A., & Luna-Rodríguez, M. (2022). Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3), 330-348. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2203-3>.
- Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Henry, P. M., Kong, M., & Broome, J. C. (2016). First report of a wilt disease of blackberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*, 100-1018. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0784-PDN>.
- Gutiérrez-Sánchez, A., Plasencia, J., Monribot-Villanueva, J. L., Rodríguez-Haas, B., Ruíz-May, E., Guerrero-Analco, J. A., & Sánchez-Rangel, D. (2023). *Virulence factors of the genus Fusarium with targets in plants*. *Microbiological Research*, 277, 127506. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127506>
- Hernández-Cruz, A., Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., & Urbina Cortez, T. B. (2015). Identification and pathogenicity of *Fusarium* sp. associated with yellowing and wilting of blackberry (*Rubus* sp.) in Michoacan, Mexico. *Phytopathology*, 105, S4.59. https://www.researchgate.net/profile/Angel-Rebollar-Alviter/publication/323747991_Identification_and_pathogenicity_of_Fusarium_sp_associated_with_yellowing_and_wilting_of_blackberry_Rubus_sp_in_Michoacan_Mexico/links/5aa8ccd6458515b024fb18ca/Identification-and-pathogenicity-of-Fusarium-sp-associated-with-yellowing-and-wilting-of-blackberry-Rubus-sp-in-Michoacan-Mexico.pdf.
- Hernández-Cruz, A., Saldivia-Tejeda A., Silva-Rojas H.V., Fuentes-Aragón D., Navaz-Díaz C., Martínez-Bolanos, L., & Rebollar- Alviter, A. (2020). Evaluation of full-season programs for the management of *Fusarium* wilt of blackberry caused by a new lineage of the *Fusarium oxysporum* species complex. *Crop Protection*, 134, 105-167. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105167>.
- Husaini, A. M., Sakina, A., & Cambay, S. R. (2018). Host-pathogen interaction in *Fusarium oxysporum* infections: Where do we stand?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31 (9), 889–898. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0302-CR>.
- Huma Gro (Bio Huma Netics, Inc.). (2020). Proud 3®. Consultado el día 6 de enero de 2025. <https://humagro.com/wp-content/uploads/2020/09/Proud-3-Label-HG-SPA.pdf>
- Ibrahim, M., El-Zahaby, H., Belal, E., Maswada, H., & Abdalla, S. (2023). Flusilazole and Penconazole had potent effects against *Fusarium oxysporum*, with no compatibility with *Trichoderma harzianum*. *Journal of Sustainable Agricultural and Environmental Sciences*, 2(1), 1-8. [doi: 10.21608/jsaes.2022.176833.1012](https://doi.org/10.21608/jsaes.2022.176833.1012).

- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (INIFAP). (2022). Al rescate y atención integral al cultivo de zarzamora. <https://www.gob.mx/inifap/articulos/al-rescate-y-atencion-integral-al-cultivo-de-zarzamora>.
- Jiménez-Díaz, R., & Montesinos, E. (2022). *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos naturaleza y control integrado*. M. V. Phytoma-España, S. L. <https://www.researchgate.net/publication/364031014>.
- Kamoun, S. (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 191–199. <https://doi.org/10.1128/ec.2.2.191-199.2003>.
- Koike, S. T., Gordon, T.R. (2015). Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Protection*, 73, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.003>.
- Kraft, J. M., & Haglund, W. A. (1978). A reappraisal of the race classification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *psi*. *Phytopathology*, 68(3), 273–275. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/P_hyto68n03_273.PDF.
- Leslie, J. F. & Sumerell, B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell.
- Martínez Soto, D., Yu, H., Allen, K. S., & Ma, L. J. (2023). Differential Colonization of the Plant Vasculature Between Endophytic Versus Pathogenic *Fusarium oxysporum* Strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 36(1), 1-10. [doi: 10.1094/MPMI-08-22-0166-SC](https://doi.org/10.1094/MPMI-08-22-0166-SC).
- Martínez-Soto, D., Li, G., & Ma, L. (2025). Methods to observe plant tissue colonization by *Fusarium oxysporum*. *Current Protocols*, 5, e70152. [doi: 10.1002/cpz1.70152](https://doi.org/10.1002/cpz1.70152).
- Matson, M. E., Small, I. M., Fry, W. E., & Judelson, H. S. (2015). Metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: assessing role of RPA190 Gene and diversity within clonal lineages. *Phytopathology*, 105(12), 1594–1600. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-15-0129-R>
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10 (3), 311–324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>.
- Mondragón-Flores, A., Manosalva, P., Ochoa-Ascencio, S., Díaz-Celaya, M., Rodríguez-Alvarado, G., & Fernández-Pavía, S. P. (2022). Characterization and fungicides sensitivity of *Phytophthora cinnamomi* isolates causing avocado root rot in Zitácuaro, Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(1), 59–81. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2109-4>.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L.N., Salcedo-Martínez, S.M., Cárdenas-Avila, M.L., & Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 32, 193-205. [627682011000200012&lng=es&tlang=es](https://doi.org/10.27550/200012&lng=es&tlang=es).
- Naik, M. K., Madhukar, H. M., & Devika Rani, G. S. (2007). Evaluation of fungicides against *Fusarium solani*, the causal agent of wilt of chilli. *Vegetable Science*, 34, 173–176. <https://www.researchgate.net/publication/267214223>.
- Ortiz-Martínez, L. E., Robles-Yerena, L., Leyva-Mir, S. G., Juárez-Rodríguez, L., & Camacho-Tapia, M. (2021). *Fusarium* sp., agente causal de la marchitez vascular en cítricos y su sensibilidad a

- fungicidas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(1), 1-17. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-3>
- Pastrana, A. M., Kirkpatrick, S. C., Kong, M., Broome, J. C., & Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a new forma specialis causing fusarium wilt of blackberry. *Plant Disease*, 101(12), 2066–2072. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0428-RE>.
- Pastrana, A. M., Watson, D. C., & Gordon, T. R. (2021). Colonization of wild blackberry plants in California by *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*. *Plant Disease*, 105(2), 264-267. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1297-RE>.
- Pérez Moreno, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., & Belmonte-Vargas, J. R. (2019). Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. *Acta Universitaria*, 29, 1–11. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2339>
- Petkar, A., Langston, D. B., Buck, J. W., Stevenson, K. L., & Ji, P. (2017). Sensitivity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to prothioconazole and thiophanate-methyl and gene mutation conferring resistance to thiophanate-methyl. *Plant Disease*, 101(2), 366–371. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1236-RE>.
- Rebollar A. A., & Silva Rojas H. (2020). *La Marchitez de la Zarzamora Diagnóstico, Epidemiología y Manejo Integrado*. Universidad Autónoma Chapingo. <https://doi:10.6084/m9.figshare.13808543>.
- Rivas-Cancino G., (sf). Manejo y Producción Forzada del Cultivo de Zarzamora. Intagri. <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/manejo-y-produccion-forzada-del-cultivo-de-zarzamora>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2024). Panorama agroalimentario. Recuperado 9 de junio 2024. https://drive.google.com/file/d/1NXcDhaB63Z94wjRUVF6f_FK0Urv6cgvJ/view.
- Shin, J. H., Lee, H. K., Back, C. G., Kang, S. hyun, Han, J. won, Lee, S. C., & Han, Y. K. (2023). Identification of *Fusarium* Basal Rot pathogens of onion and evaluation of fungicides against the pathogens. *Mycobiology*, 51(4), 264–272. <https://doi.org/10.1080/12298093.2023.2243759>.
- Syngenta México. (2025). Switch® 62.5 WG. Consultado el día 6 de enero de 2025. <https://www.syngenta.com.mx/product/crop-protection/fungicida/switchr-625-wg>
- Subhani, M. N., Sahi, S. T., Hussain, S., Ali, A., Iqbal, J., & Hameed, K. (2011). Evaluation of various fungicides for the control of gram wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *African Journal of Agricultural Research*. 6(19), 4555-4559. https://www.researchgate.net/publication/260133496_Evaluation_of_various_fungicides_for_the_control_of_gram_wilt_caused_by_Fusarium_oxysporum_fsp_ciceris.
- Taleb-Hossenkhan, N., & Ibrahim, A. (2015). Pathogenic fitness, metalaxyl sensitivity and isozyme analysis of *Phytophthora infestans* isolates from Mauritius. *Plant Pathology Journal* 14(3), 113-122. <https://doi:10.3923/ppj.2015.113.122>.
- Thind, T. S., & Hollomon, D. W. (2018). Thiocarbamate fungicides: Reliable tools in resistance

- management and future outlook. *Pest Management Science*, 74 (6), 1305–1311. <https://doi.org/10.1002/ps.4844>
- Valent México. (2025). Procure 480 SC. Consultado el día 6 de enero de 2025. https://www.valent.mx/descargas/tecnicas/TDS_Procure.pdf.
- Vincent, J.M. (1947) Distortion of Fungal Hyphae in the Presence of Certain Inhibitors. *Nature*, 159 (850). <https://doi.org/10.1038/159850b0>.
- Oruz, A. (2024). Volumen de producción mundial de fruta desde 2000 hasta 2022. Consultado el día 22 de mayo. <https://es.statista.com/estadisticas/635091/produccion-de-fruta-fresca-a-nivel-mundial-de-1990-a/>.
- Zárate-Ramos, A., Quero-Carrillo, A. R., Miranda-Jiménez, L., & Robles-Yerena, L. (2021). Fungicides and *Bacillus subtilis* against fungi isolated from commercial seed of Side oats grama (*Bouteloua curtipendula*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(1), 103-115. <https://doi:10.18781/R.MEX.FIT.2104-4>
- Zheng, Z., Zhang, Y., Wu, X., Yang, H., Ma, L., & Zhou, M. (2018). FoMyo5 motor domain substitutions (Val151 to Ala and Ser418 to Thr) cause natural resistance to fungicide phenamacril in *Fusarium oxysporum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.12.007>

Anexos

Anexo A

Agar de hojas de Clavel (CLA)

Componentes para 1 L

Hojas de clavel	4 a 5 piezas
-----------------	--------------

Agar	20g
------	-----

Agua destilada	1000ml
----------------	--------

Hojas de clavel: se requieren hojas de clavel libres de fungicidas o insecticidas, Si no se consiguen hojas libres de fungicidas o insecticidas se deben dejar alrededor de 12 horas sumergidas en agua destilada y luego realizar un proceso de desinfección como se indica a continuación:

Colocar las hojas en agua con hipoclorito al 1% durante un minuto luego enjuagarlas con agua destilada y dejarlas en alcohol al 70 % un minuto, finalmente enjuagar con agua destilada.

Después de desinfectar las hojas de clavel se deben cortar en pequeñas piezas de aproximadamente 5 a 8 mm, y se deben dejar secar en un horno a 70°C por 3 a 4 horas hasta que queden quebradizas, posteriormente se colocan en papel aluminio y esterilizan en autoclave a 121°C y 15 PSI por 20 minutos.

Disolver el agar en el agua, calentar en una plancha de calentamiento con agitación hasta ebullición, esterilizar en autoclave a una temperatura de 121°C y 15 PSI de presión por 20 minutos, dejar enfriar a más o menos 50 °C. Distribuir bajo condiciones de esterilidad aproximadamente 4 a 5 piezas de hojas de clavel en la caja petri y posteriormente servir el agar agua dejar solidificar y guardar.

Medio PDA

Agar papa Dextrosa	15g
--------------------	-----

Agua	1 L
------	-----

Medio Mínimo

Agar	1,5 g
------	-------

Sacarosa	15g
----------	-----

Sales de Vogel 50X	2ml
--------------------	-----

Agua	98 ml
------	-------

Medio Nitratos

NYB	1,36 g
-----	--------

Sacarosa	24g
----------	-----

Nitrato de Potasio	8,08 g
--------------------	--------

Agua	800 ml
------	--------

Anexo B.**Tabla .5** Resultados Infección de plantas de zarzamora con *F. oxysporum*

Aislado	Planta	Valor-escala de virulencia	Promedio	Desviación estándar
Fo1	1	5	4.64	0.63
	2	5		
	3	5		
	4	5		
	5	5		
	6	3.5		
	7	4.0		
Fo3	1	3.5	3.79	0.39
	2	3.5		
	3	3.5		
	4	4		
	5	4		
	6	4.5		
	7	3.5		
Fo7	1	3	3.79	0.86
	2	5		
	3	3.5		
	4	3.5		
	5	3		
	6	3.5		
	7	5		
GL1804	1	3	3.5	0.76
	2	4		
	3	3		
	4	3		
	5	3		
	6	3.5		
	7	5		
Control	1	1	1.0	0
	2	1		
	3	1		
	4	1		
	5	1		
	6	1		
	7	1		

Anexo C.

Tabla 6. Promedios de crecimiento(cm) de *F. oxysporum* vs fungicidas

Hongo	Procure T1	Procure T2	Derosal T1	Derosal T2	Triabendazol T1	TriabendazoleT2	Proud T1	Proud T2	Fubagro T1	Fubagro T2	Cabrio-c T1	Cabrio-c T2	Switch T1	Switch T2	Dodine T1	DodineT2	Manzate T1	Manzate T2	Captan T1	Captan T2	Jabali T1	Jabali T2	Metalaxil T1	Metalaxil T2	Azoxistrobin T1	Azoxistrobin T2	Fosfito de potasio T1	Fosfito de potasio T2	Extracto de gobernadora	T3	T4
Fe1	0.10	0.50	0.10	0.70	0.10	0.10	4.30	4.10	0.00	0.00	1.90	0.80	1.80	3.20	1.00	0.70	3.40	3.80	2.30	2.90	2.90	2.95	3.77	4.57	3.02	3.37	2.50	3.20	0.00	5.05	4.70
Fe1	0.90	0.30	0.00	0.10	0.20	0.10	4.50	4.30	0.00	0.00	1.80	1.40	1.00	1.60	0.90	0.00	3.00	4.60	2.10	2.90	3.02	2.70	4.05	4.47	3.20	3.50	2.52	3.00	0.00	5.00	4.90
Fe1	0.40	0.20	0.00	0.00	0.80	1.60	4.60	4.30	0.00	0.00	1.80	1.30	2.10	1.80	0.90	0.20	4.40	4.30	2.10	2.80	3.05	2.40	3.87	4.67	3.30	3.37	2.50	3.20	0.00	5.00	4.90
Fe2	0.20	0.80	0.10	0.00	2.00	0.10	4.90	4.00	0.20	1.20	3.00	1.60	1.40	2.00	0.90	0.00	4.60	4.60	3.00	3.00	3.02	2.27	4.52	4.47	4.45	4.02	2.15	4.45	0.00	5.00	4.37
Fe2	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	4.90	4.40	0.10	0.00	3.00	2.00	1.40	2.10	1.00	0.00	4.30	4.30	3.00	3.00	2.95	2.67	4.50	4.50	4.42	4.00	2.72	5.00	0.00	4.70	4.40
Fe2	1.30	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	4.70	4.20	0.10	0.00	2.90	1.70	1.60	3.00	0.90	0.00	4.40	4.40	3.10	3.10	3.25	2.55	4.50	4.65	4.35	4.00	2.50	5.00	0.00	5.00	5.42
Fe3	0.30	1.30	0.30	1.10	0.10	0.30	4.90	5.00	0.00	0.00	2.40	2.00	2.70	3.90	0.90	0.30	5.20	4.60	3.70	3.10	2.97	2.25	3.80	4.47	4.35	3.80	3.00	3.75	0.00	5.00	5.00
Fe3	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10	0.20	4.80	5.00	0.00	0.00	2.40	1.60	1.60	2.70	1.00	0.00	5.00	4.30	2.70	3.20	3.02	2.35	4.22	4.60	4.45	3.92	3.00	4.90	0.00	5.00	5.00
Fe3	0.10	0.30	0.10	0.00	0.10	0.10	4.60	4.30	0.00	0.00	2.50	1.60	2.10	3.10	2.10	0.00	5.10	4.40	3.60	2.90	2.90	2.57	4.57	4.50	4.10	3.77	2.90	4.55	0.00	5.00	4.92
Fe4	0.90	0.70	0.90	0.50	0.20	0.20	4.60	5.00	0.10	0.00	1.80	2.60	3.20	1.90	1.10	0.60	5.10	5.00	2.50	3.10	3.30	2.50	4.47	4.42	3.95	3.67	2.40	2.05	0.00	5.00	4.10
Fe4	0.80	0.50	0.80	0.50	0.20	0.20	4.70	5.00	0.20	0.00	2.30	2.70	2.90	2.70	0.10	0.70	5.10	4.80	2.60	3.10	3.37	2.47	4.50	4.50	4.37	3.50	2.27	1.77	0.00	5.00	4.00
Fe4	0.60	1.20	0.60	0.00	0.90	0.10	4.90	5.20	0.20	0.00	1.60	2.50	3.00	3.10	1.00	0.50	5.00	4.90	2.20	3.00	3.35	2.50	4.20	4.55	4.17	3.80	2.35	2.17	0.00	5.00	5.00
Fe5	0.90	0.70	0.60	0.00	0.30	0.20	4.30	4.90	0.00	0.00	2.40	1.60	1.80	3.00	0.90	1.40	5.00	4.80	2.50	3.10	3.15	2.50	4.50	4.57	4.55	4.02	3.15	4.30	0.00	5.00	4.72
Fe5	0.00	0.50	0.00	0.10	0.40	0.30	4.60	4.70	0.00	0.20	3.00	1.80	2.80	1.90	0.80	1.60	5.20	4.90	3.70	2.60	3.35	2.50	4.45	4.55	4.62	3.97	2.90	4.50	0.00	5.00	4.52
Fe5	0.00	0.80	0.00	0.00	0.30	0.20	4.70	4.20	0.00	0.20	2.40	1.90	1.70	2.60	1.00	0.00	5.00	5.00	2.60	2.90	3.52	2.42	4.45	4.35	4.45	4.12	2.80	4.45	0.00	5.00	4.55
Fe6	0.00	0.70	0.00	0.00	0.20	0.30	5.00	4.40	0.00	0.00	2.60	1.50	1.60	1.70	1.00	0.10	5.40	4.90	0.40	3.00	2.32	2.40	4.55	4.40	4.07	3.55	2.60	4.90	0.00	4.62	4.52
Fe6	0.00	0.87	0.00	0.00	0.10	0.30	4.90	4.80	0.00	0.00	2.80	2.00	3.20	2.40	0.80	0.50	5.40	5.00	2.80	3.00	2.25	2.37	4.60	4.57	4.25	3.45	2.62	5.00	0.00	5.00	4.57
Fe6	0.00	1.00	0.60	0.00	0.20	0.00	4.70	4.10	0.00	0.00	2.90	1.20	4.00	2.10	1.00	0.00	5.20	5.00	2.40	3.00	2.35	2.22	4.70	4.52	4.15	3.35	2.70	4.90	0.00	5.00	4.57
Fe7	0.10	0.50	0.00	0.30	0.10	0.10	5.00	4.20	0.00	0.00	2.50	1.50	1.50	2.10	1.00	0.00	5.10	4.50	2.40	2.80	3.10	2.15	4.37	4.50	4.22	4.02	2.50	3.67	0.00	5.00	4.67
Fe7	0.20	1.00	0.00	0.00	0.20	0.10	5.00	4.30	0.00	0.00	2.70	1.70	1.40	2.50	0.90	0.40	4.80	5.00	2.00	2.60	3.25	2.12	4.40	4.57	3.92	4.00	2.50	3.57	0.00	5.00	4.67
Fe7	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10	0.20	5.00	4.70	0.00	0.00	2.90	1.60	2.10	2.30	1.00	0.60	4.80	4.40	2.20	2.90	3.07	2.12	4.50	4.57	3.57	4.00	2.40	3.70	0.00	5.00	4.70
GL1804	0.00	0.00	0.00	0.00	1.45	1.00	4.52	4.80	1.18	0.26	1.70	0.90	0.78	1.80	1.40	0.65	3.20	0.00	0.20	0.20	2.40	1.82	4.12	4.37	2.90	3.15	3.45	3.72	0.00	5.00	4.62
GL1804	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	0.90	4.62	4.60	1.10	0.34	1.00	1.30	0.70	1.26	1.20	0.35	3.50	0.00	0.46	0.40	2.10	1.75	4.62	4.40	2.70	2.90	3.37	4.65	0.00	5.00	4.70
GL1804	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.90	4.60	4.90	1.05	0.35	1.25	1.30	0.68	1.70	1.30	0.60	3.50	0.00	0.20	1.50	2.32	1.65	4.17	4.42	2.85	3.17	3.47	5.00	0.00	5.00	4.70
3001	0.00	0.00	0.00	0.00	1.30	0.00	4.82	5.00	1.80	1.20	1.76	0.72	0.83	1.95	1.40	0.85	3.88	0.50	1.16	0.25	2.15	0.00	4.62	4.55	3.03	2.12	3.35	5.00	0.00	5.00	4.67
F3001	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	0.00	4.77	5.00	1.10	1.20	1.66	0.90	0.90	1.50	1.66	0.75	3.68	0.00	1.06	0.40	2.22	0.00	4.35	4.45	3.00	3.30	3.30	5.00	0.00	5.00	5.00
F3001	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.92	5.00	1.70	1.50	1.60	0.90	0.85	1.90	1.80	0.80	4.30	0.00	1.40	0.40	2.27	0.00	4.45	4.57	3.10	3.15	2.85	4.40	0.00	5.00	5.00

Anexo D.

Tabla 8. Aislados con diferencias significativas Tratamiento 1

Fungicida	Aislados con diferencias significativas
Trifumizol	Fo3 y Fo4
	Fo4 y Fo7
	Fo4 y GL1804, F3001
Extractos vegetales	Fo1 a Fo7 y 1804, 3001
Tiabendazol	Fo1, Fo3, Fo4, Fo5, Fo6, Fo7 y GL1804
	Fo2 y Fo3, Fo6, Fo7
	Fo3 y GL1804, F3001
Dodina	Fo3 y Fo4
	Fo4, Fo5 y F3001
Cyprodinil and Fludioxonil	Fo1 y Fo4
	Fo1 y Fo6
	Fo1 a Fo7 y GL1804
	Fo1 y F3001
	Fo2 y Fo3, Fo4, Fo6
	Fo3 y Fo4, Fo6
	Fo3 a Fo7 y F3001
	Fo4 y Fo5, Fo7
	Fo5 y Fo6
	Fo6 y Fo7
Captan	Fo1 y Fo2, Fo3, Fo5
	Fo1 a Fo7 y GL1804
	Fo1 y F3001
	Fo2 y Fo4, Fo6, Fo7
	Fo2 y F3001
	Fo3 y Fo4, Fo6, Fo7
	Fo3 y F3001
	Fo4 y Fo6
	Fo4 y F3001
	Fo5 y Fo6, Fo7
	Fo5 y F3001
	Fo7 y F3001
	GL1804 y F3001
Pyraclostrobin and Boscalid	Fo1 y Fo2, Fo3, Fo5, Fo6, Fo7
	Fo2 y Fo3
	Fo2 y Fo4
	Fo2, Fo3, Fo5, Fo6, Fo7 y GL1804
	Fo2 y F3001
	Fo3 y F3001
	Fo4 y Fo5, Fo6, Fo7
	Fo5 y F3001
	Fo6 y F3001
	Fo7 y F3001
Fosfito de potasio	Fo1 y GL1804
	Fo2 y GL1804
	Fo3 y Fo4
	Fo4 y Fo5
	Fo4 y GL1804
	Fo4 y F3001
	Fo6 y GL1804
	Fo7 y GL1804
Fosetil-al	Fo1 a Fo7 y Fo6
	Fo1 y F3001
	Fo2 y GL1804
	Fo2 y F3001
	Fo3 y F3001
	Fo4 y GL1804
	Fo4 y F3001
	Fo5 y GL1804
	Fo5 y F3001
	Fo7 y GL1804
Azoxistrobin	Fo1 y F3001
	Fo1 y Fo2 a Fo7
	Fo2 y Fo7
	Fo2 a Fo7 y GL1804
	Fo2 a Fo7 y F3001
Metalaxyl	Fo5 y Fo7
	Fo1 y Fo2
Mancozeb	Fo1 y Fo6
	Fo1 y Fo2 a Fo7
	Fo2 a Fo7 y GL1804
	Fo2 a Fo7 y F3001

Anexo E

Tabla 9. Aislados con diferencias significativas Tratamiento 2

Fungicida	Aislados con diferencias significativas
Trifumizol	Fo1 a Fo7 y Fo6
	Fo4 y GL1804
	Fo4 y F3001
	Fo6 y GL1804, F3001
Extractos vegetales	Fo1 a Fo7 vs 3001
	GL1804 y F3001
Tiabendazol	Fo2 a Fo7 vs GL1804
	GL1804 y F3001
Dodina	Fo1 y Fo5
	Fo2 y Fo4
	Fo2 y Fo5
	Fo2 y F3001
	Fo3 y Fo5
	Fo5 y Fo6
	Fo5 y Fo7
Cyprodinil and Fludioxonil	Fo1 y Fo3
	Fo2 y Fo3
	Fo2 y GL1804
	Fo2 y F3001
	Fo3 y Fo5, Fo6, Fo7
	Fo3 y GL1804, F3001
	Fo4 y GL1804, F3001
Captan	Fo5 y GL1804, F3001
	Fo1 a Fo7 y GL1804, F3001
Pyraclostrobin and Boscalid	Fo2 y GL1804, F3001
	Fo1 y Fo2, Fo4, F05,
	Fo2 y Fo4
	Fo2 y GL1804, F3001
	Fo3 y Fo4, Fo7
	Fo3 y F3001
	Fo4 y Fo5, Fo6, F07
	Fo4 y GL1804, F3001
	Fo5 y F3001
Fosfito de potasio	Fo6 y F3001
	Fo7 y F3001
	Fo1 y Fo2, Fo3, Fo4, Fo5, Fo6, Fo7
	Fo1 y GL1804
	Fo1 y F3001
	Fo2 y Fo4, Fo7
	Fo3 y Fo4
	Fo4 y Fo5
	Fo4 y Fo6, Fo7
	Fo4 y GL1804, F3001
	Fo5 y Fo7
Fosetil-al	Fo6 y Fo7
	Fo7 y GL1804, F3001
	Fo1 y GL1804, F3001
	Fo2 y GL1804, F3001
	Fo1vs GL1804, F3001
	Fo3 y F3001
	Fo4 y GL1804, F3001
	Fo5 y GL1804, F3001
Azoxistrobin	Fo6 y F3001
	Fo7 y F3001
	GL1804 y F3001
	Fo1 y Fo2, Fo4, Fo5, Fo7
	Fo2 y Fo3, Fo6
	Fo2 y GL1804, F3001
	Fo3 y F3001
	Fo4 y GL1804, F3001
Mancozeb	Fo5 y Fo6
	Fo5 y GL1804, F3001
	Fo6 y F3001
	Fo7 y GL1804, F3001
	Fo1 a Fo7 y GL1804, F3001

Anexo F

Tabla 10. Datos para la obtención de la curva de crecimiento de *F. oxysporum* 3

Tiempo	Replica	Peso(g)	Media peso(g)	D. Estandar	Proteína total mg/ml	Media Proteína total	D. Estandar proteína total
24	1	0.05	0.07	0.02	0.45	1.85	1.29
	2	0.09			2.12		
	3	0.06			2.98		
48	1	1.45	1.77	0.46	79.75	86.71	9.87
	2	1.56			82.37		
	3	2.29			98.00		
72	1	1.71	1.81	0.21	87.36	84.25	12.01
	2	1.66			71.00		
	3	2.05			94.40		
96	1	2.05	1.94	0.10	38.34	35.72	2.75
	2	1.88			35.96		
	3	1.88			32.86		
120	1	0.93	0.98	0.22	21.00	19.92	7.28
	2	0.78			12.17		
	3	1.22			26.60		
144	1	1.12	0.87	0.22	25.09	17.57	6.66
	2	0.78			12.42		
	3	0.71			15.19		