

PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A PLANTAS DE FRESA (*Fragaria ananassa*) Y DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL PATOSISTEMA

Milagro Granados-Montero^{1/*}, Mariam Zúñiga-Castañeda²,
Priscila Chaverri-Echandi³, Efraín Escudero-Leyva⁴, Melissa Mardones-Hidalgo⁵

Palabras clave: Microscopia electrónica; fitopatógenos; *Fusarium oxysporum*; *Neonectria* sp;
Dactylonectria sp; *Sydowia polyspora*.

Keywords: Electron microscopy; phytopathogens; *Fusarium oxysporum*; *Neonectria* sp;
Dactylonectria sp; *Sydowia polyspora*.

Recibido: 08/10/2021

Aceptado: 25/03/2022

RESUMEN

Introducción. El cultivo de fresa (*Fragaria ananassa*) es importante en Costa Rica por su alta demanda como fruta fresca y para elaboración de mermeladas. En 2015 empezaron reportes de muerte de plantas, presumiblemente, asociada a complejos de hongos habitantes en el suelo. Los síntomas eran enrojecimiento y necrosis de hojas, coronas, raíces y luego, el desplome de las plantas. Con pérdidas hasta del 90% en plantaciones nuevas. **Objetivo.** Determinar la patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa enfermas y describir la micro morfología del patosistema. **Materiales y métodos.** Se colectaron plantas enfermas variedad Festival, y se realizaron aislamientos a partir de corona y raíz. Se clasificaron los morfotipos recuperados,

ABSTRACT

Pathogenicity of fungi associated with strawberry plants (*Fragaria ananassa*) and ultrastructural description of the pathosystem.

Introduction. Strawberries are important in Costa Rica due to their high demand as fresh fruit and for making jams. In 2015, reports of plant death began, presumably associated with soil-dwelling fungal complexes. The symptoms were redness and necrosis of leaves, crowns, and roots, then the collapse of the plants. With losses of up to 90% in new plantations. **Objective.** To determine the pathogenicity of fungi associated with diseased strawberry plants and to describe the micromorphology of the pathosystem. **Materials and methods.** Diseased Festival variety plants were collected, and isolations

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: maria.granadosmontero@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit y Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMic), San José Costa Rica.

 0000-0002-0321-7729.

2 Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, (MAG-DRCO), Cartago, Costa Rica.

 0000-0003-3416-820X.

3 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), Costa Rica y University of Maryland, Department of Plant Sciences and Landscape Architecture, College Park, Maryland, U.S.A.

 0000-0002-8486-6033.

4 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Biología, San José, Costa Rica.

 0000-0003-4440-4296.

5 Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, San José, Costa Rica.

 0000-0002-4402-7817.

se eligieron 3 para secuenciación del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés) y ejecución de los Postulados de Koch, con $3,5 \times 10^5$ conidios/ml inoculados en gránulos de alfalfa. Las plantas se mantuvieron 19 semanas en ambiente protegido. Luego, se realizó el reaislamiento y la secuenciación de los hongos inoculados y se describió el patosistema por medio de microscopía electrónica de barrido. **Resultados.** Se obtuvieron 10 aislamientos de hongos de corona y 22 de raíz, que se clasificaron en 9 morfotipos. Se eligieron 3 que de acuerdo con el ITS, se ubicaron en las unidades taxonómicas operativas *Fusarium oxysporum*, *Neonectria/Dactylonectria* y *Sydowia polyspora*. Se registró 100% de incidencia en todas las plantas inoculadas y los síntomas coincidieron con los de campo, mientras que el testigo permaneció sano. Los porcentajes de similitud de las secuencias de ITS de los hongos aislados de plantas enfermas provenientes de campo y de los hongos recuperados de la prueba de patogenicidad, fueron $> 99\%$. A nivel ultraestructural se observó que las raíces pierden la epidermis y son colonizadas por los hongos. **Conclusión.** Los hongos inoculados fueron patógenos a plantas de fresa variedad Festival; además, tuvieron la capacidad de dañar la epidermis radical y multiplicarse internamente.

were made from crown and root. The recovered morphotypes were classified, three were chosen for sequencing of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (nrDNA ITS) and execution of Koch's Postulates, with 3.5×10^5 conidia/ml inoculated in alfalfa granules. The plants were kept for 19 weeks in a protected environment. Then, re-isolation and sequencing of the inoculated fungi was performed, and the pathosystem was described by means of scanning electron microscopy. **Results.** Ten isolates of crown and 22 root fungi were obtained, which were classified into 9 morphotypes. Three were chosen, which, according to the ITS, were in the operational taxonomic units *Fusarium oxysporum*, *Neonectria/Dactylonectria* and *Sydowia polyspora*. The 100% incidence was recorded in all the inoculated plants and the symptoms coincided with those in the field, while the control remained healthy. The similarity percentages of the ITS sequences of the fungi isolated from diseased plants, from the field, and of the fungi recovered from the pathogenicity test, were $> 99\%$. At the ultrastructural level, it was observed that the roots lose the epidermis and are colonized by fungi. **Conclusion.** The inoculated fungi were pathogenic to Festival variety strawberry plants, they had the ability to damage the root epidermis and multiply internally.

INTRODUCCIÓN

La planta de fresa [*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.] produce frutos de vida útil muy corta, la cual depende de la temperatura de almacenamiento, Acosta (2019) indicó que el período varía entre 2 y 8 días, a 37°C y 4°C , respectivamente. Los frutos son considerados como un alimento funcional, debido a su alto contenido de vitamina C, taninos y antioxidantes, ya que proporcionan beneficios a la salud humana, como protección contra eventos cardiovasculares (Do Carmo *et al.* 2015).

En Costa Rica, el cultivo es permanente y está en manos de pequeños productores, repartidos en 342 fincas, la mayoría (39%) ubicadas en la provincia de Cartago, seguida de Alajuela y San José, con 21% cada una, y finalmente, Heredia con el 16%. Además, se reportan 9 fincas productoras de fresa, en la provincia de Puntarenas (INEC 2015).

Según datos generados en los censos locales realizados por las Agencias de Extensión del Ministerio de Agricultura y Ganadería, que dan apoyo a los productores de las zonas de Poás y

Llano Grande, se registró una reducción de 93 ha de cultivo entre 2016-2017 (Avendaño 2017, Zuñiga 2017).

Esta disminución en área se asume que se debió principalmente a la aparición de una enfermedad de etiología desconocida, que provoca la muerte de lotes enteros. La sintomatología que describen los productores es marchitez y muerte de plantas en estado reproductivo, la cual inicia con coloración anormal de las hojas bajas, que se tornan rojizo-púrpura, desde el margen hacia la lámina con deshidratación hasta senescer. El sistema radical es pobre, con zonas necróticas y reducido sistema absorbente.

Al disectar las plantas enfermas fue posible observar diversos grados de decoloración de la médula de la corona, que van desde puntados rojizos en tejido compacto, hasta áreas extensas de consistencia friable con tonalidades cobre-rojizas.

Desde 2005, se han reportado problemas fitosanitarios en fresa en el ámbito mundial, que se denominaron pudrición de raíz y corona y que han sido asociados a diferentes especies de hongos. En Australia, se definió que los agentes asociados a la muerte de plantas eran *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* (FOF) y *Phytophthora cactorum*, aislados de corona y raíces, respectivamente. También, reportaron la presencia de *Pythium* spp., *Phoma* spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp. y *Macrophomina* spp. (Golzar *et al.* 2007). *Fusarium oxysporum* se ha reportado en otros países como Corea, China, España, Estados Unidos, Japón y México (Suga *et al.* 2013; Bracénas-Santana *et al.* 2019) y la enfermedad se conoce como marchitez por *Fusarium* o secadera de la fresa.

En España y Estados Unidos se observó colapso y secamiento de plantas de fresa de distintas variedades, denominada pudrición carbonosa; se concluyó por medio de pruebas de patogenicidad, que el causante de la enfermedad era *Macrophomina phaseolina*. Al parecer, la aparición del daño está relacionada al desuso del bromuro de metilo y a condiciones de estrés por

clima cálido y riego escaso (Avilés *et al.* 2008, Koike *et al.* 2013).

De acuerdo con los mismos autores, los síntomas de marchitez y pudrición carbonosa son indistinguibles en el campo, ya que ambos ocurren en las mismas zonas, por lo que cualquier finca puede tener las 2 enfermedades.

En 2016, España reportó al hongo *Neopestalotiopsis clavispora* como el causante de la pudre de corona y raíz en fresa (Chamorro *et al.* 2016). Finalmente, en 2017, Weber y Entrop indicaron que anamorfos tipo *Cylindrocarpon* tenían un rol importante en el complejo denominado muerte negra de las raíces de fresa y frambuesa en Alemania.

Por lo expuesto, en 2017 se inició una investigación con el fin de determinar la patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa enfermas en Costa Rica; así como, describir morfológicamente la relación hospedero-patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y aislamientos. Se recolectaron 6 plantas enfermas de fresa variedad Festival, provenientes de 3 fincas ubicadas en el distrito de Llano Grande, Cartago. Se trasladaron al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica; luego se procedió a describir los síntomas (Figura 1) y a realizar aislamientos a partir de raíces y coronas en medio de cultivo agar agua rosa de bengala (AARb). Los aislamientos se incubaron a 24°C en oscuridad por 7 días. Luego, se realizaron cultivos de punta de hifa en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Una vez desarrollados, se determinaron los morfotipos recuperados de acuerdo con la coloración del cultivo y características microscópicas como tipo de conidioma, conidióforo y conidio. Se eligieron 3 para la prueba de patogenicidad, de acuerdo con la posible capacidad patogénica informada en la literatura.

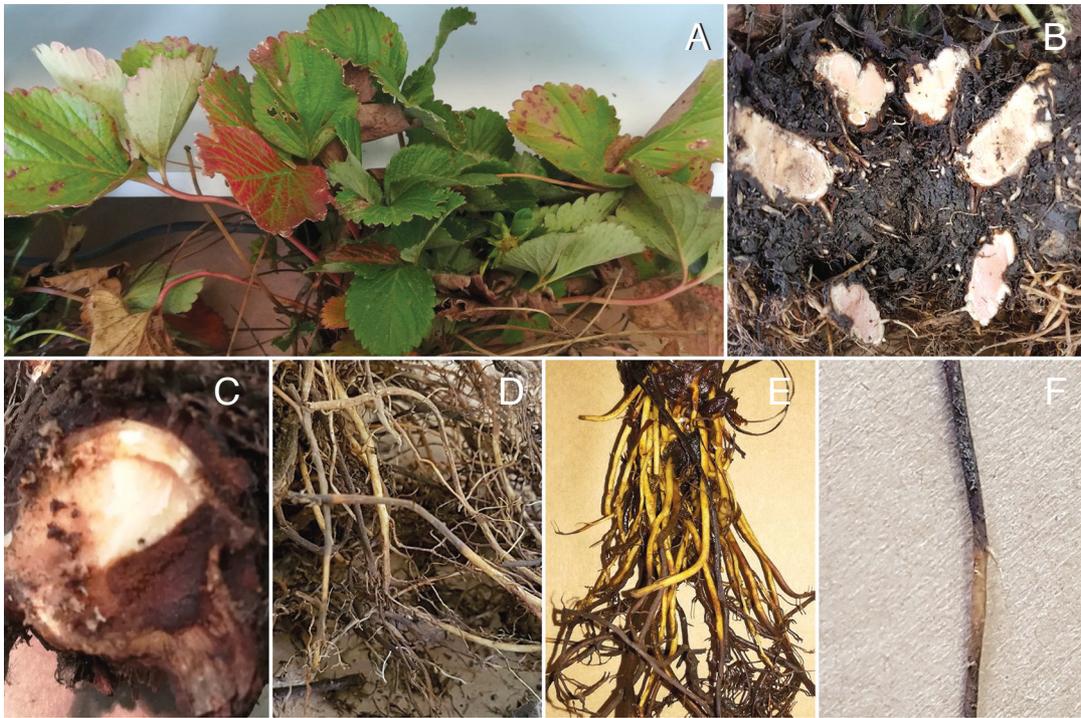


Figura 1. Síntomas de colapso de plantas de fresa variedad Festival recolectadas en campo. A. Síntomas en follaje. B y C. Síntomas en corona. D, E y F. Síntomas en raíz.

En el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica, se extrajo el ADN de los morfotipos seleccionados, por medio del kit Prepman Ultra (Applied Biosystems™). Se realizó PCR de la región del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés), código de barras fúngico (Schoch *et al.* 2012), con los imprimadores ITS 5 e ITS 4 (White *et al.* 1990). Los productos se enviaron a Macrogen (USA) para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el programa Geneious 11.1.5., y luego se compararon con las bases de datos del NCBI mediante BLAST. Se consideró en el rango de especie aquellas secuencias que obtuvieron similitudes de 100%. Si el porcentaje fue del 99% se definió como posible especie (cf.) y si se obtuvo entre 96-98% se determinó como

especie relacionada (aff.) (Hofstetter *et al.* 2019). Con respecto al rango de género se consideró una similitud del 97% (López *et al.* 2017). Las secuencias de ITS de los morfotipos seleccionados fueron depositadas en GenBank.

Prueba de patogenicidad. Se preparó inóculo a base de alimento para caballo de “Forraje completo”, compuesto de gránulos de alfalfa. Se usó la metodología de Leslie y Summerell (2007). Se manejaron suspensiones de $3,5 \times 10^5$ conidios/ml de cada morfotipo para la inoculación del sustrato.

Se utilizaron 25 plantas de fresa variedad Festival, producidas en invernadero, bajo sistema hidropónico, para cada hongo a evaluar y 25 como control, para un total de 100 plantas. Todas se sembraron en bolsas negras de polietileno de 3L con granza quemada esterilizada y mezclada con 10g de sustrato inoculado con las

suspensiones conidiales, excepto el sustrato de las plantas control.

Las plantas se mantuvieron durante un ciclo completo de producción de 19 semanas, para exponerlas tanto a la etapa vegetativa como reproductiva.

La prueba se ubicó bajo invernadero, no hubo precipitación desde enero hasta marzo. En abril se registraron 26 mm, en mayo 450 mm y junio 83 mm. El sitio alcanzó una temperatura

máxima de 26,2°C y una temperatura mínima de 17,9°C; la humedad relativa varió entre 31,6 y 87,6 (Figura 2).

Trascurrido ese período, se trasladaron al laboratorio para realizar el registro de síntomas internos a nivel de corona y raíz. Se realizaron aislamientos a partir de tejidos con y sin síntomas visibles. Además, se tomó muestra de tejido sintomático para el procesamiento en microscopía electrónica de barrido.

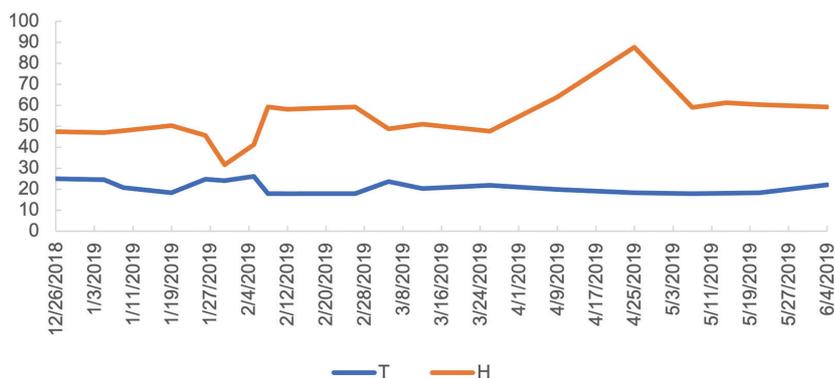


Figura 2. Temperatura (T) en °C y porcentaje de humedad relativa (H) registrada semanalmente durante el período de la prueba de patogenicidad de *Fusarium oxysporum*, *Neonectria* sp. y *Sydowia polyspora* en plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival bajo invernadero.

Los aislamientos, extracción y secuenciación de ADN se realizaron de la misma manera que para los aislamientos originales. Las secuencias de ITS de los hongos inoculados fueron depositadas en GenBank. Luego se procedió a comparar las identidades de los hongos inoculados con las de los hongos recuperados.

Descripción ultraestructural del pato-sistema. Se tomaron secciones de raíz de las plantas enfermas como producto de la prueba de patogenicidad, y se colocaron en solución fijadora de Karnovsky compuesta por glutaraldehído 2,5%, paraformaldehído 2%, sacarosa al 4% en amortiguador de fosfatos de sodio 0,1M pH 7,4. Posteriormente, las muestras se lavaron con amortiguador y se post-fijaron con tetraóxido de osmio 2%. Después se deshidrataron con un

gradiente ascendente de etanoles (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°, 100°) y se secaron por punto crítico. Una vez secas, se cubrieron con una capa de 200nm de oro y se observaron con el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3700N.

RESULTADOS

Aislamientos iniciales e identificación molecular. Se obtuvieron 10 aislamientos de tejido proveniente de coronas con manchas de apariencia corchosa, y 22 aislamientos de raíces, a partir de diversos síntomas como necrosis, manchas naranjas y café, que fueron clasificados en 9 morfotipos (Tabla 1), nombrados de acuerdo con las características del cultivo en PDA, como coloración, tipo de conidioma, conidióforos y conidios.

Tabla 1. Características y cantidad de morfotipos recuperados a partir de corona y raíz de plantas de fresa cv. Festival enfermas. Llano Grande, Cartago, Costa Rica. 2017.

Morfotipo	Coloración del cultivo*	Conidioma	Conidióforos	Conidios	Cantidad de aislamientos según órgano de la planta	
					Corona	Raíz
<i>Cladosporium</i>	gris-oliva	ausente	libres	polimórficos, amero y didimo	0	1
^{ab} <i>Cylindrocarpon</i> **	café-ambar	ausente	fiálides	macro y micro	1	3
^b <i>Fusarium</i> **	blanco-rosa-violeta	ausente	polifiálides	macro y micro	0	2
Dothideomycete**	gris oscuro-oliva	picnidios	célula conidiógena	amero	5	2
Mucoral	gris	ausente	esporangióforo-columela	unicelular	0	1
No identificado	blanco-beige	ausente	libres	amero	0	4
<i>Penicillium</i>	verde-gris	ausente	libres-penicilados	amero	1	1
<i>Pestalotiopsis</i>	blanco	acérvulos	célula conidiógena	fragmo	3	5
<i>Trichoderma</i>	verde	ausente	libres	amero	0	3

aAnamorfos tipo *Cylindrocarpon*

bProdujeron clamidosporas

*Siete días de crecimiento en PDA a la oscuridad, $\pm 24^{\circ}\text{C}$

**Morfotipos seleccionados para la prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó con los aislamientos: F2 del morfotipo *Fusarium*, F33 del morfotipo anamorfo tipo *Cylindrocarpon*, ambos recuperados de raíz, y el aislamiento F238 del morfotipo Dothideomycete, proveniente de corona. La secuenciación del producto de

amplificación del ITS indicó que las unidades taxonómicas operativas para esos aislamientos corresponden a *Fusarium oxysporum* (F2), *Neonectria* sp. (F33) y *Sydowia polyspora* (F238), respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Código de aislamiento, morfotipo, identificación molecular, número accesión en GenBank, accesión de comparación y % de similitud, de la secuencia de ITS de individuos aislados a partir de plantas enfermas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival. Llano Grande, Cartago, Costa Rica. 2018.

Código aislamiento	Morfotipo	Identificación molecular	Número de accesión en GenBank	Accesión de comparación	% de similitud
F2	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	MW622035	EU849584	99,6
F33	<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Neonectria</i> sp.	MW622037	JX243950	99,2
F238	Dothideomycete	<i>Sydowia polyspora</i>	MW622039	KF993419	99,8

Prueba de patogenicidad. La sintomatología del follaje fue inespecífica, ya que todas las plantas a nivel foliar expresaron los síntomas de enrojecimiento, manchas foliares, quema de bordes y senescencia, incluso se presentó en las plantas control (Figura 3A).

En las coronas el daño se presentó de distintas maneras, en las plantas inoculadas con *Sydowia polyspora*, 58% de las coronas presentaba puntos café o amarillos en el centro o hacia los lados, el 42% restante no presentó síntomas visibles. Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron 55% de lesiones café con aspecto corchoso y el 45% restante no presentó síntomas. En las inoculadas con *Neonectria* sp. los síntomas en la corona fueron de un 50% con puntos café de aspecto corchoso y la otra mitad no presentaba síntomas visibles. Las plantas sin

inocular no presentaron síntomas visibles (Figura 3B, D, F, H).

Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron raíces secundarias abundantes, lesiones cobrizas aleatorias y coloración rojiza generalizada. Las plantas inoculadas con *Neonectria* sp. perdieron importante volumen radical (no cuantificado), las raíces que permanecieron mostraron necrosis intensa tipo tizón y muy poco sistema absorbente. Por su parte, las plantas inoculadas con *S. polyspora* mostraron daños radicales intermedios, siempre con presencia de necrosis y coloración rojiza; además las plantas en general se observaron de menor tamaño. Mientras que, las plantas sin inocular tenían raíces abundantes y asintomáticas (Figura 3C, D, G, I).



Figura 3. Apariencia de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival, luego de 19 semanas en invernadero. A. Síntomas en follaje. B–C. Corona y sistema radical de planta control (sin inocular). D–E. Corona y sistema radical de planta inoculada con *Fusarium oxysporum* s.l (F2). F–G. Corona y sistema radical de planta inoculada con *Neonectria* sp. (F33). H–I. Corona y sistema radical de planta inoculada con *Sydowia polyspora* (F238).

De los aislamientos obtenidos a partir de tejido enfermo de plantas inoculadas, se recuperaron aislamientos con los mismos morfotipos inoculados (Figura 4). Se eligieron 3 aislamientos: F2_52, F33_50 y F238_49 (Tabla 3) para realizar la identificación molecular, la cual

indicó que los aislamientos F2_52 y F238_49 corresponden a los mismos organismos aislados de las plantas de campo, *F. oxysporum* y *S. polyspora*, respectivamente. En el caso del aislamiento F33_50, la secuencia del ITS lo asoció con una especie de *Dactylonectria*.

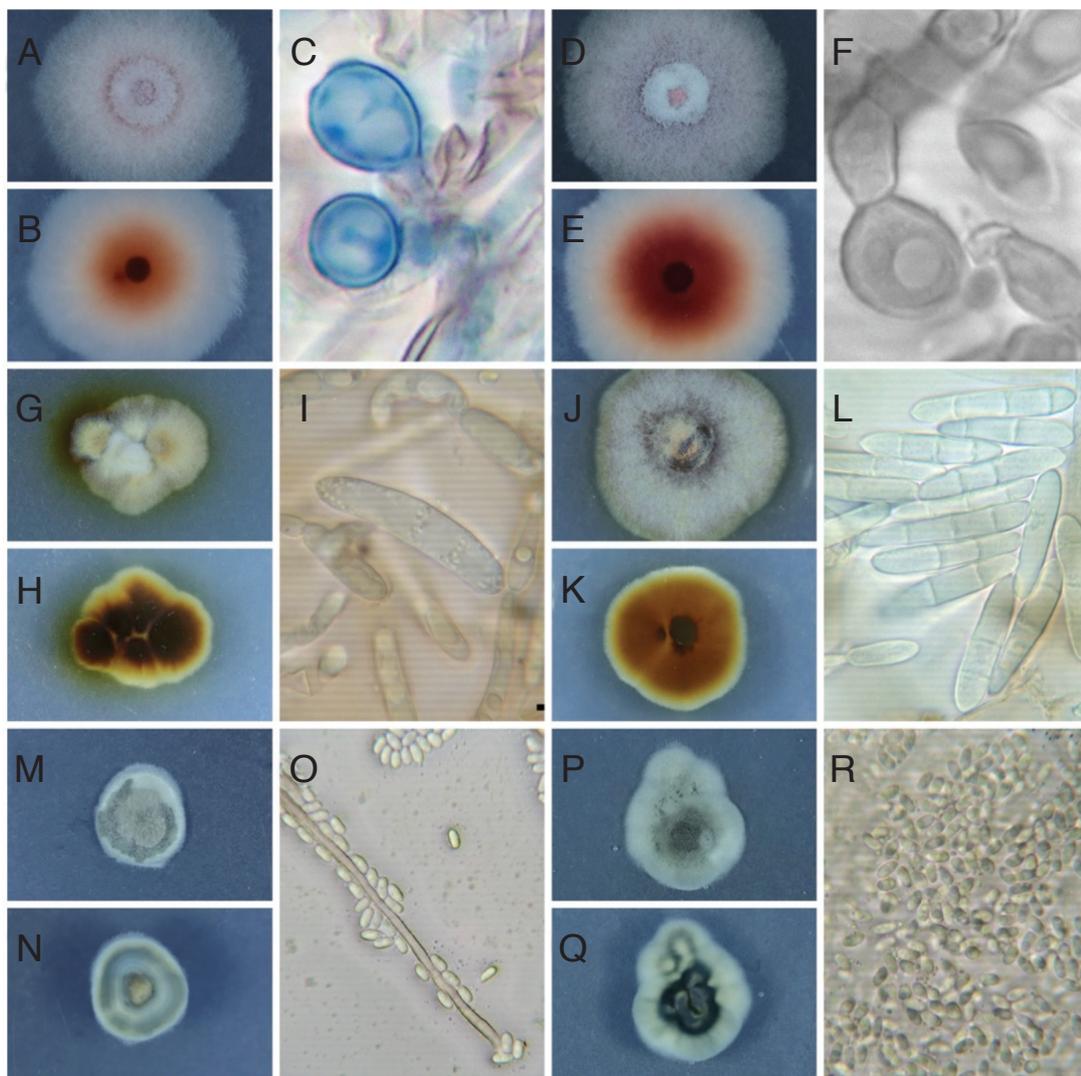


Figura 4. Características morfológicas de los aislamientos inoculados y recuperados a partir de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival, luego de 19 semanas en invernadero. A, B y C. Aislamiento F2, *Fusarium oxysporum* s.l., luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Clamidosporas. D, E y F. Aislamiento F2_52, *Fusarium oxysporum* s.l., luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Clamidosporas. G, H e I. Aislamiento F33, *Neonectria* sp. luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Macroconidios. J, K y L. Aislamiento F33_50, *Dactylonectria* sp., luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Macroconidios y un microconidio. M, N y O. Aislamiento F238, *Sydowia polyspora*, luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Hifa y conidios. P, Q y R. Aislamiento F238_49, *Sydowia polyspora*, luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Conidios.

Tabla 3. Código de aislamientos a partir de plantas inoculadas, identificación molecular, número de accesión en GenBank, accesión de comparación y % de similitud, de las secuencias de ITS de individuos de los morfotipos recuperados a partir de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziarsp.) variedad Festival inoculadas para la prueba de patogenicidad. Llano Grande, Cartago, Costa Rica. 2018.

Código de aislamientos a partir de plantas inoculadas	Identificación molecular	Número de accesión en GenBank	Accesión de comparación	% de similitud
F2_52	<i>Fusarium oxysporum</i>	MW622036	EU849584	99,6
F33_50	<i>Dactylonectria</i> sp.	MW622038	JX244050	99,4
F238_49	<i>Sydowia polyspora</i>	MW622040	KF993419	99,8

Descripción ultraestructural. Las observaciones en el microscopio electrónico de barrido mostraron que las raíces de plantas enfermas presentaron desintegración de la epidermis, lo que deja al descubierto la corteza radical, además adherencia y germinación de esporas, así como colonización del parénquima cortical (Figuras 5, 6 y 7).

En el caso de las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* y anamorfos tipo *Cylindrocarpon* fue posible observar la presencia de

conidióforos tipo fiálides (Figuras 5C y 7C). Para *S. polyspora* se apreció el desarrollo de una densa red de hifas (Figura 6B). En todas se notó la presencia de material tipo granular.

En plantas colonizadas por el aislamiento F33 (anamorfos tipo *Cylindrocarpon*) se observó desprendimiento de la corteza y exposición de la endodermis cerca de la caliptra (Figura 7A), el daño se pudo observar tanto en raíces primarias como en pelos absorbentes (Figura 7A, D).

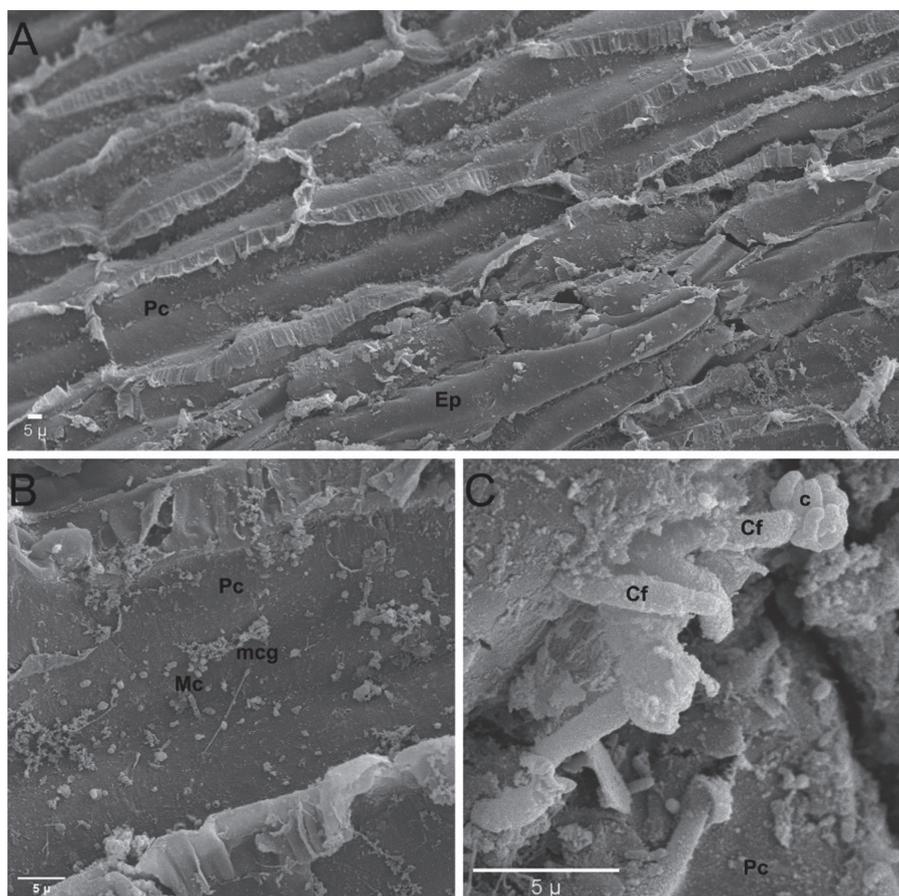


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de raíces de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas con el aislamiento F2 (*Fusarium oxysporum* s.l), luego de 19 semanas en invernadero. A. Raíz principal con pérdida casi total de epidermis (Ep) y exposición del parénquima cortical (Pc). B. Presencia de macroconidios (Mc) y microconidios (mc) en las zonas sin epidermis, algunos en proceso de germinación (mcg). C. Presencia de conidióforos tipo monofálide (Cf) con cabeza de microconidios (c).

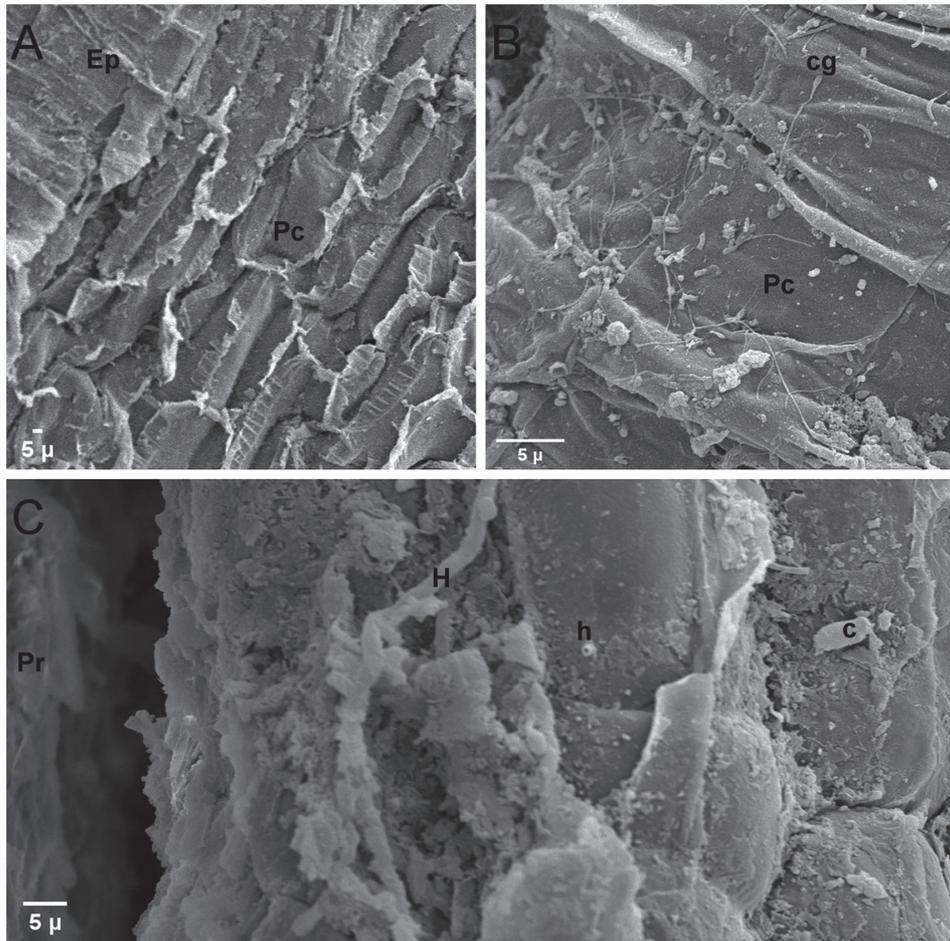


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de raíces de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas con el aislamiento F238 (*Sydowia polyspora*), luego de 19 semanas en invernadero. A. Pérdida de epidermis (Ep) y exposición del parénquima cortical (Pc). B. Germinación de conidios (cg) sobre parénquima cortical. C. Desarrollo de hifas (H y h) cerca del punto de inserción de un pelo radical (Pr). Presencia de un conidio (c).

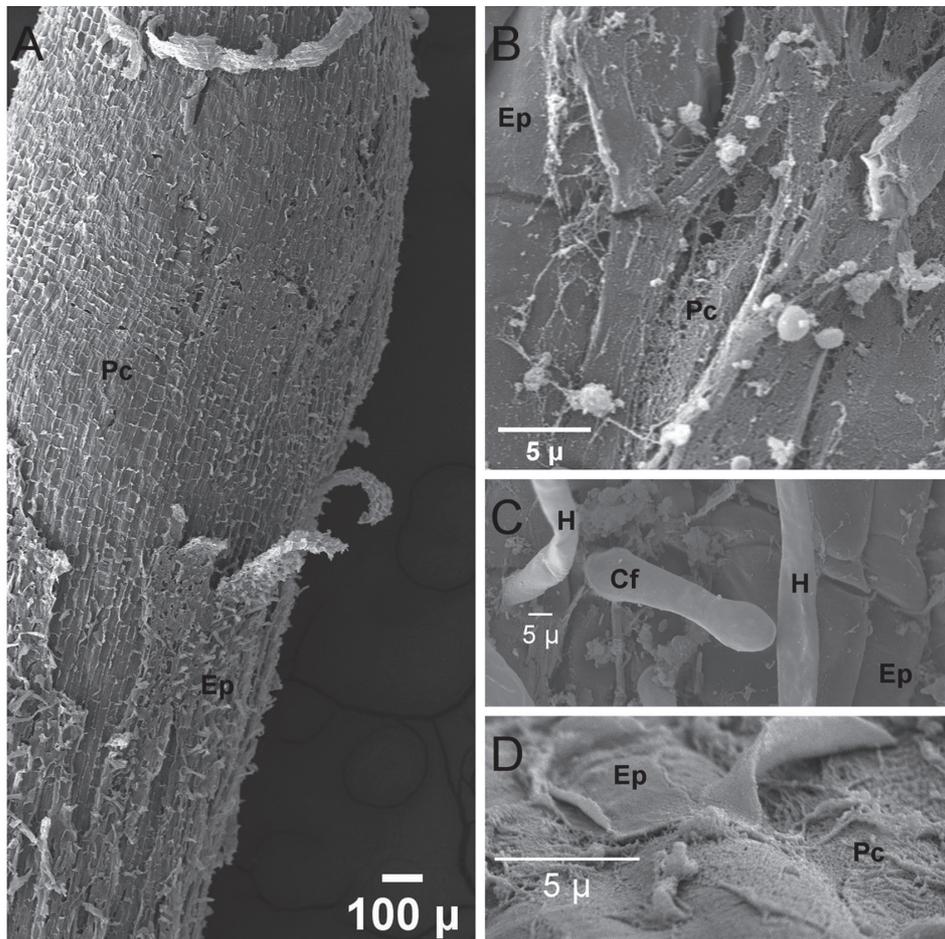


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de raíces de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas con el aislamiento F33 (*Neonectria* sp./*Dactylonectria* sp.), luego de 19 semanas en invernadero. A. Ápice radical con pérdida de epidermis (Ep), exposición de parénquima cortical (Pc). B. Detalle del área dañada. C. Presencia de hifas (H) y conidióforo (Cf) en la epidermis. D. Daño en la superficie de un pelo radical.

DISCUSIÓN

Las pruebas de patogenicidad realizadas en invernadero demostraron la reproducibilidad de los síntomas observados en campo. Mostró que es posible diferenciar por medio de la sintomatología a nivel de corona cual hongo está asociado a una sintomatología en particular; mientras que, los síntomas expresados en follaje, no son decisivos, ya que incluso para las plantas

no inoculadas, fue posible registrar la aparición de enrojecimiento, bordes quemados y senescencia prematura (Figura 3).

Esto indica que, dichas alteraciones están más relacionadas a algún tipo de estrés abiótico que a un hongo de forma específica, aunque la infección puede acrecentar los síntomas. Weber y Entrop (2017) indicaron que plantas expuestas a estrés por sequía o saturación de humedad presentan síntomas más severos.

También, se comprobó que los 3 hongos inoculados provocan el deterioro del sistema radical y que hay algunas diferencias en la magnitud de la sintomatología expresada de acuerdo con el género de hongo que cause la infección. El aporte en las plantas inoculadas con anamorfos tipo *Cylindrocarpon* (*Neonectria/Dactylonectria*) y *S. polyspora* se notó mayor disminución en el volumen del sistema radical, lesiones más severas y pérdida casi total de los pelos absorbentes, en comparación con las inoculadas con *F. oxysporum* y las no inoculadas (Figura 3C, E, G, I).

La sintomatología observada, tanto en campo como en la prueba de patogenicidad, concordó con los síntomas documentados por varios autores. Al respecto, Koike (2008) y Hutton *et al.* (2013) mencionaron que pueden deberse a *Macrophomina phaseolina*; además, Williamsom *et al.* (2012) y Koike *et al.* (2013) indican que los síntomas se asocian a *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, mientras que Adhikari *et al.* (2013), así como, Weber y Entrop (2017) señalan que anamorfos tipo *Cylindrocarpon* son responsables de estos síntomas. En igual forma, CABI (2019) informa que *Neonectria radicola* provoca la podredumbre negra del frenal, con síntomas como plantas pequeñas, crecimiento pobre a nivel radical, decoloración y retraso en el crecimiento de los tallos y las coronas.

En esta investigación se determinó que los aislamientos recuperados de campo y clasificados como morfotipos de *Fusarium* (F2), *Cylindrocarpon* (F33), y Dothideomycete (F238) corresponden a las unidades taxonómicas operativas *Fusarium oxysporum*, *Neonectria/Dactylonectria*, y *Sydowia polyspora*, respectivamente. Esto concuerda en parte por lo expuesto anteriormente, referente a los posibles agentes causales de la enfermedad. Fang *et al.* (2011) mencionan que tanto *Fusarium oxysporum* como *Cylindrocarpon destructans* pueden ser recuperados a partir de raíces y coronas de plantas de fresa. Para *S. polyspora*, no hay reporte en el cultivo de fresa en ninguna parte del mundo, por lo que esta sería la primera vez que se registre este hongo que causa daño en el cultivo.

Fusarium oxysporum ha sido relacionado a marchitez de fresa desde 1965 por Winks y Williams, desde entonces, se han realizado caracterizaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares del patógeno y se ha mantenido vigente que es la forma especial *fragariae* la causante de la pudrición de corona y raíz de la fresa (Henry *et al.* 2021).

Sin embargo, existen diferencias en susceptibilidad por parte de las variedades, como Fang *et al.* (2012a y b, 2013) y Paynter *et al.* (2014, 2016) indican que la variedad Festival es resistente a FOF, por lo que es posible que el aislamiento utilizado en esta investigación no corresponda a esta forma especial. Incluso, es posible que ni siquiera corresponda a la especie *F. oxysporum* en el sentido estricto, y más bien sea otra especie dentro del complejo de especies "*Fusarium oxysporum*" (FOFC) o que pertenezca a otro complejo.

Cabe decir que, en 2018 Salazar *et al.*, determinaron por medios bioquímicos (BIOLOG) que los aislamientos identificados morfológicamente como *F. oxysporum* correspondieron no solo a esta especie, sino también a cepas de *F. lateritium*, *F. udum* y *F. sacchari*, así como a otras no identificadas. Por otro lado, mediante los marcadores *tef-1* y β -tubulina, Ayoubi y Soleimani (2016) reportaron que las especies *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. equiseti* y el complejo *F. incarnatum-equiseti* tienen la capacidad de infectar plantas de fresa en Irán.

Lo que indica la necesidad de realizar una identificación molecular más precisa, con el uso de varios marcadores como *tef-1*, *rpb2* y β tubulina. Se deberían utilizar adicionalmente, marcadores específicos para FOF como FofraF y FofraR diseñados por Suga *et al.* (2013), para corroborar si se trata de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que efectivamente se trate de FOF, y que el aislamiento inoculado haya tenido la posibilidad romper la resistencia de la variedad. Recientemente, Henry *et al.* (2021) especula acerca de la posibilidad de razas para este patógeno, basados

en que las plantas de fresa solamente tienen un locus que confiere resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, el gen *FW1*, por lo que es factible que el patógeno supere la resistencia de un cultivar específico.

Esto podría explicar por qué los conidios del aislamiento F2 (*F. oxysporum sensu lato*) tuvieron la capacidad para germinar, desarrollarse, penetrar y desintegrar la epidermis radical y colonizar el parénquima cortical de las raíces de plantas variedad Festival (Figura 4) considerada resistente a la infección por este hongo, sin embargo, en esta investigación la variedad se comportó como susceptible al aislamiento de *F. oxysporum* inoculado.

Según observaciones por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) realizadas por Fang *et al.* (2012b) en la variedad Festival la penetración de FOF se restringió a la epidermis radical y el patógeno no ingresó al tejido vascular, por lo que no se presentó decoloración de la corona ni marchitamiento de plantas, comportamiento opuesto al hallado en este trabajo. Estos investigadores indican que en la variedad Festival la germinación de las esporas, la penetración, crecimiento de las hifas y colonización de la superficie radical fue impedida debido a que las plantas exudan metabolitos secundarios, compuestos fenólicos y enzimas que inhiben estos procesos, mientras que en la variedad susceptible Camarosa se produjo menor cantidad de metabolitos inhibitorios, lo que permitió la colonización de las raíces y los haces vasculares, que provocan enfermedad.

Otras observaciones realizadas por los mismos autores indican que las uniones y depresiones de la epidermis son los sitios preferidos de acumulación de esporas y penetración de este hongo y que esta tendencia puede deberse a la acumulación de nutrientes en estas zonas. Por el contrario, Yuan *et al.* (2014), en observaciones realizadas por medio de microscopía de fluorescencia, mencionan que las esporas se pueden adherir de forma aleatoria en cualquier zona de la raíz, comportamiento evidenciado en esta investigación.

En otros patosistemas, por ejemplo, en arveja–*F. oxysporum* f.sp. *pisi* raza 2, se ha encontrado que las accesiones resistentes establecen barreras estructurales que impiden la penetración del hongo, como reforzamiento de las paredes, formación de papilas y acumulación de diversas sustancias a nivel radicular (Bani *et al.* 2018).

Otro caso del proceso de penetración relacionado a patosistemas raza específicos es el de banano–*F. oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 y raza 4. En estos sistemas patológicos se observó por medio de MEB que la raza 4 (FOCR4) tiene la capacidad de ingresar a las raíces de banano (*Musa* AAA) variedad Cavendish a través de heridas y de espacios intercelulares; mientras que FOCR1 solo puede hacerlo mediante heridas (Li *et al.* 2017), lo que está directamente relacionado con la susceptibilidad de la variedad, según la raza presente.

Según lo expuesto, se hace relevante definir con exactitud la identidad del aislamiento de *Fusarium* utilizado en esta investigación, y de esta forma entender mejor el patosistema y las posibilidades de manejo.

De igual manera, se debe profundizar en la identificación de los aislamientos F33 y F238, ya que aunque se utilizó el código de barras para hongos (ITS), este no permitió resolver las especies de géneros crípticos como *Cylindrocarpon*. Al respecto, Cabral *et al.* (2012) usaron además del ITS, β tubulina, histona y el factor de elongación 1- α para discriminar entre especies de este género. En este sentido, Lombard *et al.* (2014) hicieron una re-evaluación minuciosa de la familia Nectriaceae, la cual posee gran cantidad de anamorfos tipo *Cylindrocarpon*, por medio de análisis multigénico, usaron 10 marcadores, LSU, ITS, *act1*, *rpb1*, *rpb2*, *act*, *tub2*, *cmdA*, *his3* y *tef-al* para distinguir entre géneros.

Cylindrocarpon y las especies tipo *Cylindrocarpon* son organismos con distribución mundial, mayormente patógenos de suelo, que sobreviven en residuos de cosecha y sustratos en descomposición, aunque también, pueden mantenerse como endófitos. Normalmente causan

pudre basal y radical, algunas ocasionan canchales en árboles. Las formas asexuales de *Cylindrocarpon* fueron asociadas con la forma sexual conocida como *Neonectria* Wollenw. (Gordillo y Decock 2017, Lawrence *et al.* 2019).

De acuerdo con Chaverri *et al.* (2011) *Neonectria* sp. es un género cosmopolita y capaz de provocar pudriciones radicales. Estos autores ubican el género dentro de los grupos 1 y 4 de *Cylindrocarpon* según la clasificación de Booth (1966), y en el mismo clado que *Ilyonectria*. En 2013, Rosmann *et al.* propusieron mantener el nombre genérico de *Neonectria* sobre el de *Cylindrocarpon*. De acuerdo con Jayawardena (2019) tanto *Cylindrocarpon* sensu stricto como *Neonectria* sensu stricto pertenecen a la familia Nectriaceae, al igual que *Dactylonectria*. Indicaron también que, este último es similar morfológicamente a *Ilyonectria* y *Neonectria*.

Lawrence *et al.* (2019) identificaron, por medio de análisis filogenético (ITS+*tub2*+*tef-1*), a partir de 12 aislamientos con morfología tipo *Cylindrocarpon* (provenientes de pie negro de la uva) especies tanto de *Neonectria* sensu stricto como de *Dactylonectria* sensu stricto, lo que confirmó que es posible recuperar ambos géneros asociados a morfotipos de *Cylindrocarpon* y que es necesario un análisis multigénico para determinar con certeza la identidad de los aislamientos.

De acuerdo con estas personas autoras, las especies tipo *Cylindrocarpon* causan pudriciones necróticas tanto en coronas como en raíces. En las coronas se observa decoloración y daño vascular, mientras que en las raíces se producen lesiones hundidas y pérdida de biomasa, en general se produce disminución progresiva del vigor del cultivo. Síntomas análogos a los observados en esta investigación y en plantas de campo, hace pensar que podría ocurrir lo mismo en el cultivo de fresa en Costa Rica.

Al respecto, Jayawardena (2019) anota como hospedero de *Dactylonectria* al género *Fragaria* L., y concuerda con Lawrence *et al.* (2019) en la sintomatología que este patógeno provoca en uva, describen severas necrosis

radicales, marchitamiento, clorosis, pardeamiento y senescencia prematura del follaje.

Habibi y Ghaderi (2020), Chen *et al.* (2021), así como, Erper *et al.* (2021), comprobaron que las especies *D. torresensis*, *D. macrodiuma*, *D. novezealandica* y *D. pausiseptata* son las responsables de la pudrición radical necrótica en fresa. También mencionaron que provoca severos daños radicales, decoloración de coronas y colapso de plantas, lo que reafirma la idea de que en Costa Rica este hongo tiene la capacidad de provocar los daños obtenidos a partir de la prueba de patogenicidad.

Adicionalmente, y aunque para *Sydowia polyspora* solo se hallaron reportes de identificación molecular con ITS (Talgå *et al.* 2010, Thambugala *et al.* 2014, Silva *et al.* 2020), es importante ratificar su identidad debido a que no ha sido reportado con anterioridad como patógeno de fresa. Este hongo ha sido mayormente asociado a especies de coníferas (Pan *et al.* 2018), que ha causado daños en plantaciones forestales.

En BLAST hay varias secuencias de ITS cercanamente relacionadas a las secuencias depositadas en esta investigación y a secuencias identificadas como *S. polyspora* que fueron aisladas a partir de infecciones necróticas en varias angiospermas, e incluyen gramíneas y especies leñosas. Otra razón, para corroborar la identidad, es que el sinamormo hifal (conocido como *Hormonema dematioides*) está reportado como patógeno en humanos (Coldiron *et al.* 1990, Jong Hee Shin *et al.* 1998), lo que podría representar un riesgo para la salud de los productores.

El aislamiento F238, colectado de coronas enfermas en campo, fue capaz de colonizar las raíces primarias y secundarias (Figura 5) y de causar enfermedad en plantas de fresa variedad Festival (Figura 2H, I). El hongo degradó la epidermis radical y colonizó el parénquima cortical, lo que provocó lesiones necróticas y pérdida de pelos absorbentes, así como, necrosamiento de los haces vasculares, amarillamiento foliar y menor crecimiento de las plantas.

Asimismo, las raíces de plantas colonizadas por el aislamiento F33 también mostraron

desintegración de la epidermis, tanto en raíces primarias como pelos absorbentes, hasta el punto de dejar expuesta la endodermis de la caliptra de raíces principales, además, se evidencia la digestión de las paredes celulares epidérmicas (Figura 6), lo que indica la capacidad del hongo para penetrar de forma directa por medio de la secreción de enzimas.

Todo lo anterior, comprueba la capacidad de estos 3 hongos para inducir enfermedad en plantas de fresa variedad Festival. Los daños observados tienen impacto en la producción, ya que tanto las alteraciones en la parte aérea como radical, disturban la producción de asimilados y la adquisición de agua y nutrientes requeridos para el desarrollo de las plantas, debido a la pérdida de área fotosintéticamente activa y raíces absorbentes. Dicho aspecto cobra relevancia cuando la planta entra en estado reproductivo.

En este sentido, los productores indican que en la etapa de reproducción es donde se observa la enfermedad con mayor intensidad, fenómeno que se observó también en esta investigación y fue confirmado por Husaini y Neri (2016) al indicar que, síntomas como marchitamiento del follaje, secado de las hojas viejas y retraso del crecimiento de las plantas, provocan disminución en la producción de frutos.

La diferenciación de síntomas expresados en corona de acuerdo con el hongo inoculado podría suministrar información en condiciones de campo, ya que, los productores al disectar la planta tendrían un acercamiento al posible agente causal, lo que permitiría elegir la estrategia de manejo de forma más acertada. Sin embargo, no todas las plantas expresan sintomatología en corona, como se registró en este estudio, lo que puede afectar el diagnóstico.

Finalmente, se debe mencionar que existe la posibilidad de que las plantas hijas desarrolladas a partir de estolones de plantas enfermas, puedan transmitir la enfermedad, ya que el fenómeno fue observado en esta investigación (datos no suministrados). Al respecto, Pastrana *et al.* (2019) encontraron que las raíces y los peciolos de plantas hijas de la segunda generación,

presentaron infección con *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* (FOF) aunque no con síntomas. Se observó en las plantas inoculadas en esta prueba de patogenicidad, que alrededor del 50% de las plantas no presentaban síntomas en la corona, aunque estaban colonizadas por los hongos; lo que significa que mediante observación visual se subestima la incidencia real de la enfermedad. Esto es sumamente riesgoso, debido a que los productores pueden usar este material para iniciar nuevas plantaciones al asumir que se encuentra sano.

CONCLUSIÓN

Estos hallazgos permiten asociar la muerte de plantas de fresa a los hongos estudiados, ya que tuvieron la capacidad de dañar la epidermis radical, multiplicarse internamente y provocar síntomas visibles; sin embargo, es relevante continuar con investigaciones tendientes a comprender la relación que existe entre estos patógenos y posibles condiciones de estrés que predisponen las plantas al ataque.

Adicionalmente, se sientan las bases de próximos estudios destinados a conocer la diversidad e interacciones de otros patógenos de fresa, así como, la posibilidad de identificar especies poco estudiadas asociadas a estos complejos que podrían representar enfermedades emergentes con alto potencial patogénico.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTA-CORI) por el financiamiento parcial de la investigación por medio del proyecto F04-18, a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento parcial por medio del proyecto B7A16 inscrito en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, al Centro de Investigación en Protección de Cultivos por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología. Al Ministerio de

Agricultura y Ganadería por el apoyo mediante las Agencias de Extensión y del Servicio Fito-sanitario del Estado en la recolecta del material.

LITERATURA CITADA

- Adhikari, TB; Hodges, CS; Louws, FJ. 2013. First report of *Cylindrocarpon* sp. associated with root rot disease of strawberry in North Carolina (en línea). Plant Disease 97(9):1251-1251. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0116-PDN>
- Avendaño, L. 2017. Cultivo de fresa en área de Poás y alrededores. (Presentación Powerpoint PITTA-FRESA). San José, Costa Rica. 5 diapositivas. (en línea) Consultado 25 jun. 2018. Disponible en http://www.snitta.org/web/pittas.php?p=32&s=PUBLICACIONES_PROYECTOS
- Avilés, M; Castillo, S; Bascon, J; Zea-Bonilla, T; Martín-Sánchez, PM; Pérez-Jiménez, RM. 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. Plant Pathology 57(2):382.
- Ayoubi, N; Soleimani, M. J. 2016. Morphological and molecular identification of pathogenic *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. Sydowia 68:163-171.
- Bani, M; Pérez-de-Luque, A; Rubiales, D; Rispaill, N. 2018. Physical and chemical barriers in root tissues contribute to quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* in Pea. Frontiers in Plant Science 9:1-16.
- Bárceñas-Santana, D; Guillén-Sánchez, D; Yazmín-Basaldúa, C; Ramos-García, MDL; Valle-de la Paz, M. 2019. Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology 37(3):454-463.
- Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. Mycological Papers 104:1-56.
- CABI. 2019. *Neonectria radicola* (black root of strawberry). Datasheet. Additional resources. Invasive species compendium. (en línea). Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://www.cabi.org/isc/datasheet/35974>
- Cabral, A; Groenewald, JZ; Rego, C; Oliveira, H; Crous, PW. 2012. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycological Progress 11(3):655-688.
- Chamorro, M; Aguado, A; De los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. Plant Disease. (en línea). Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>
- Chaverri, P; Salgado, C; Hirooka, Y; Rossman, AY; Samuels, GJ. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Studies in Mycology 68:57-78.
- Chen, Q; Yin, SL; Zhang, XG; Ma, XY; Zhong, S; Zhang, GZ. 2021. *Dactylonectria* species associated with black root rot of strawberry in China. Australasian Plant Pathology 50(5):501-511.
- Coldiron, BM. 1990. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by a rare fungal pathogen, *Hormonema dematioides*: successful treatment with ketoconazole. Journal of the American Academy of Dermatology 23(2):363-367.
- Do Carmo, E; Viana, M; Morais, A. 2015. Coprodutos da agroindustria processadora de polpa de fruta congelada *Fragaria* sp. como fonte de alimento funcional. C&D-Revista Eletrônica da Fainor, Vitória da Conquista 8(2):108-113.
- Erper, I; Ozer, G; Alkan, M; Zholdosbekova, S; Turkkan, M. 2021. First report of *Dactylonectria torresensis* causing black root rot of strawberries in Kyrgyzstan. Journal of Plant Pathology 103(1):379-380.
- Fang, X; Phillips, D; Verheyen, G; Li, H; Sivasithamparam, K; Barbetti, MJ. 2011. Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia. Australasian Plant Pathology 40:109-119.
- Fang, X; Phillips, D; Verheyen, G; Li, H; Sivasithamparam, K; Barbetti, MJ. 2012a. Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field, and cultivar responses to pathogens under controlled environment conditions. Phytopathologia Mediterranea 51(1):69-84.
- Fang, X; Kuo, J; You, MP; Finnegan, PM; Barbetti, MJ. 2012b. Comparative root colonisation of strawberry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant and Soil 358 (1-2):75-89.
- Fang, X; Jost, R; Finnegan, PM; Barbetti, MJ. 2013. Comparative proteome analysis of the strawberry-*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* pathosystem reveals early activation of defense responses as a crucial determinant of host resistance. Journal of Proteome Research 12(4):1772-1788.
- Golzar, H; Phillips, D; Mack, S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. Australasian Plant Disease Notes 2(1):145.
- Gordillo, A; Decock, C. 2017. *Cylindrocarpon*-like (Ascomycota, Hypocreales) species from the amazonian rain forests in Ecuador: additions to *Campylocarpon* and *Dactylonectria*. Cryptogamie Mycologie 38(4):409-434.

- Habibi, A; Gadheri, F. 2020. First record of *Dactylonectria macrodidyma* causing black root rot on strawberry. *Mycologia Iranica* 7:241-246.
- Henry, PM; Pincot, DDA; Jenner, BN; Borrero, C; Aviles, M; Nam, MH; Epstein, L; Knapp, SJ; Gordon, TR. 2021. Horizontal chromosome transfer and independent evolution drive diversification in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *New Phytologist* 230(1):327-340.
- Hofstetter, V; Buyck, B; Eyssartier, G; Schnee, S; Gindro, K. 2019. The unbearable lightness of sequenced-based identification. *s.l., s.e.*, 96:243-284 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00428-3>
- Husaini, AM; Neri, D. 2016. Strawberry: growth, development and diseases. Massachusetts, USA, CAB International. 313 p.
- Hutton, DG; Gomez, AO; Mattner, SW. 2013. Macrophomina phaseolina and Its association with strawberry crown rot in Australia. *International Journal of Fruit Science* 13(1-2):149-155.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2015. VI Censo Nacional Agropecuario: Cultivos agrícolas, forestales y ornamentales. 285 p.
- Jayawardena, RS; Hyde, KD; McKenzie, EHC; Jeewon, R; Phillips, AJL; Perera, R H; de Silva, NI; Maharachchikumburua, SSN; Samarakoon, MC; Ekanayake, AH; Tennakoon, DS; Dissanayake, AJ; Norphanphoun, C; Lin, C; Manawasinghe, IS; Tian, Q; Brahmanage, R; Chomnunti, P; Hongsanant, S; ...Wang, Y. 2019. One stop shop III: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity* 98(1):51-75.
- Jong Hee Shin; Sang Ku Lee; Soon Pal Suh; Dong Wook Ryang; Nam Ho Kim; Rinaldi, MG; Sutton, DA. 1998. Fatal *Hormonema dematioides* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis: Criteria for organism identification and review of other known fungal etiologic agents. *Journal of Clinical Microbiology* 36(7):2157-2163. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.36.7.2157-2163.1998>
- Koike, ST. 2008. Crown rot of strawberry, caused by *Macrophomina phaseolina*, in California. *Plant Dis.* 92:1253.
- Koike, ST; Gordon, TR; Daugovish, O; Ajwa, H; Bolda, M; Subbarao, K. 2013. Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. *International Journal of Fruit Science* 13(1-2):76-83.
- Lawrence, DP; Nouri, M; Trouillas, F. 2019. Taxonomy and multi-locus phylogeny of *Cylindrocarpon*-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. *Fungal Systematics and Evolution* 4:59-75.
- Leslie, J; Summerell, B. 2007. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. 387 p.
- Li, C; Yang, J; Li, W; Sun, J; Peng, M. 2017. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. *Plant Disease* 101(12): 2073-2078.
- Lombard, L; Merwe, A; Groenewald, JZ; Crous, PW; Lombard, L; Merwe, N; Groenewald, JZ; Crous, PW. 2014. Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3):515-532.
- López-González, RC; Gómez-Cornelio, S; De la Rosa-García, SC; Garrido, E; Oropeza-Mariano, O; Heil, M; Partida-Martínez, LP. 2017. The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology* 26:1-10.
- Pan, Y; Ye, H; Lu, J; Chen, P; Zhou, XD; Qiao, M; Yu, ZF. 2018. Isolation and identification of *Sydowia polyspora* and its pathogenicity on *Pinus yunnanensis* in Southwestern China. *Journal of Phytopathology* 166(6):386-395.
- Paynter, ML; Czislawski, E; Herrington, ME; Aitken, EAB. 2016. Differences in pathogenicity, genetic variability and cultivar responses among isolates of *Fusarium oxysporum* from strawberry in Australia. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 141(6):645-652.
- Paynter, ML; De Faveri, J; Herrington, ME. 2014. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and predicted breeding values in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 139(2):178-184.
- Pastrana, AM; Watson, DC; Gordon, TR. 2019. Transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* through stolons in strawberry plants. *Plant Disease* 103(6):1249-1251.
- Rossmann, AY; Seifert, KA; Samuels, GJ; Minnis, AM; Schroers, H-J; Lombard, L; Crous, PW; Pöldmaa, K; Cannon, PF; Summerbell, RC; Geiser, DM; Zhuang, W; Hirooka, Y; Herrera, C; Salgado-Salazar, C; Chaverri, P. 2013. Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection (en línea). *IMA Fungus* 4(1):41-51. DOI: <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.05>
- Schoch, CL; Seifert, KA; Huhndorf, S; Robert, V; Spouge, JL; Levesque, CA; Chen, W; Bolchacova, E; Voigt, K; Crous, PW; Miller, AN; Wingfield, MJ; Aime, MC; An, KD; Bai, FY; Barreto, RW; Begerow, D; Bergeron, MJ; Blackwell, M; Boekhout, T; Bogale, M; Boonyuen, N; Burgaz, AR; Buyck, B; Cai, L; Cai, Q; Cardinali, G; Chaverri, P; Coppins, BJ; Crespo, A; Cubas, P; Cummings, C; Damm, U; de Beer, ZW; de Hoog, GS; Del-Prado, R; Dentinger, B; Diéguez-Urbeondo, J; Divakar, PK;

- Douglas, B; Dueñas, M; Duong, TA; Eberhardt, U; Edwards, JE; Elshahed, MS; Fliegerova, K; Furtado, M; García, MA; Ge, ZW; Griffith, GW; Griffiths, K; Groenewald, JZ; Groenewald, M; Grube, M; Gryzenhout, M; Guo, LD; Hagen, F; Hambleton, S; Hamelin, RC; Hansen, K; Harrold, P; Heller, G; Herrera, C; Hirayama, K; Hirooka, Y; Ho, HM; Hoffmann, K; Hofstetter, V; Högnabba, F; Hollingsworth, PM; Hong, SB; Hosaka, K; Houbraken, J; Hughes, K; Huhtinen, S; Hyde, KD; James, T; Johnson, EM; Johnson, JE; Johnston, PR; Jones, EBG; Kelly, LJ; Kirk, PM; Knapp, DG; Kõljalg, U; Kovács, GM; Kurtzman, CP; Landvik, S; Leavitt, SD; Ligenstoffer, AS; Liimatainen, K; Lombard, L; Luangsa-ard, JJ; Lumbsch, HT; Maganti, H; Maharachchikumbura, SSN; Martin, MP; May, TW; McTaggart, AR; Methven, AS; Meyer, W; Moncalvo, JM; Mongkolsamrit, S; Nagy, LG; Nilsson, RH; Niskanen, T; Nyilasi, I; Okada, G; Okane, I; Olariaga, I; Otte, J; Papp, T; Park, D; Petkovits, T; Pino-Bodas, R; Quaedvlieg, W; Raja, HA; Redecker, D; Rintoul, TL; Ruibal, C; Sarmiento-Ramírez, JM; Schmitt, I; Schüßler, A; Shearer, C; Sotome, K; Stefani, FOP; Stenroos, S; Stielow, B; Stockinger, H; Suetrong, S; Suh, SO; Sung, GH; Suzuki, M; Tanaka, K; Tedersoo, L; Telleria, MT; Tretter, E; Untereiner, WA; Urbina, H; Vágvölgyi, C; Vialle, A; Vu, TD; Walther, G; Wang, QM; Wang, Y; Weir, BS; Weiß, M; White, MM; Xu, J; Yahr, R; Yang, ZL; Yurkov, A; Zamora, JC; Zhang, N; Zhuang, WY; Schindel, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(16):6241-6246.
- Salazar, S; Bayas-Morejón, F; Niño, Z; Guevara, J; Ruilova, M; Merino, O; Donato, W; Guamán, J. 2018. Morphological and biochemical indicators of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* in strawberry crops (*Fragaria x ananassa* Duch) in the province of Pichincha, Ecuador. Agronomy Research 16(4):1854-1861.
- Silva, AC; Henriques, J; Diogo, E; Ramos, AP; Bragança, H. 2020. First report of *Sydowia polyspora* causing disease on *Pinus pinea* shoots. Forest Pathology 50(1):27-30.
- Suga, H; Hirayama, Y; Morishima, M; Suzuki, T; Kageyama, K; Hyakumach, M. 2013. Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant Disease 97(5):619-625.
- Talgø, V; Chastagner, G; Thomsen, IM; Cech, T; Riley, K; Lange, K; Klemsdal, SS; Stensvand, A. 2010. *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.) Fungal Biology 114(7):545-554.
- Thambugala, KM; Ariyawansa, HA; Li, YM; Boonmee, S; Hongsanan, S; Tian, Q; Singtripop, C; Bhat, DJ; Camporesi, E; Jayawardena, R; Liu, ZY; Xu, JC; Chukeatirote, E; Hyde, KD. 2014. Dothideales. Fungal Diversity 68(1):105-158.
- Weber, RWS; Entrop, AP. 2017. *Dactylonectria torresensis* als wichtigste Komponente der Schwarzen Wurzelfäule an Erdbeeren und Himbeeren in Norddeutschland. Erwerbs-Obstbau 59(3):157-169.
- White T; Bruns S; Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M; Gelfand DH; Sninsky, JJ; White, TJ (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, p. 315-322.
- Williamson, M; Fernández-Ortuño, D; Schnabel, G. 2012. First report of *Fusarium* Wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in South Carolina (en línea). Plant Disease 96(6):911-911. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0164-PDN>
- Winks, B; Williams, Y. 1965. A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science 22:475-479.
- Yuan, H; Ling, X; Liu, T; Chen, T; Yang, Y; Yao, S; Zhang, B. 2014. Microscopic observations of strawberry plant colonization by a GFP-labelled strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Canadian Journal of Plant Pathology 36(4):501-508.
- Zúñiga, M. 2017. Producción de fresa. Llano Grande de Cartago. (Presentación Powerpoint PITTA-FRESA). San José, Costa Rica. 7 diapositivas. (en línea). Consultado 25 jun 2018. Disponible en http://www.snitta.org/web/pittas.php?p=32&s=PUBLICACIONES_PROYECTOS

