

Presencia de fungoresistencia del hongo *Botrytis cinerea* Whetzel aislado de fresa a tres grupos de fungicidas sistémicos

Presence of fungal resistance of the fungus *Botrytis cinerea* Whetzel isolated from strawberry to three groups of systemic fungicides

Alisson Klethley Parada Vera¹, Brayan Jesús Lizcano Gelvez², Leónides Castellanos González³, Carmen Omaira Roza García⁴

¹Ing. Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. Vía Bucaramanga Km 1. Pamplona. Colombia. alisson.parada@unipamplona.edu.co. <https://orcid.org/0009-0009-7931-8823>

²Ing. Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. Vía Bucaramanga Km 1. Pamplona. Colombia. brayan.lizcano@unipamploma.edu.co. <https://orcid.org/0009-0009-4646-2490>

³Ing. Agrónomo. PhD. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. Vía Bucaramanga Km 1. Pamplona. Colombia. lclcastell@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0001-9285-4879>

⁴MSc Microbiólogo. MsC- Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Vía Bucaramanga Km 1. Pamplona. Colombia. omairaroz@unipamplona.edu.co. <https://orcid.org/0000-0001-6545-2268>

Cite this article as: A. Parada-Vera, B. Lizcano-Gelvez, L. Castellanos-González, C. Roza García “Presencia de fungoresistencia del hongo *Botrytis cinerea* Whetzel aislado de fresa a tres grupos de fungicidas sistémicos”, Prospectiva, Vol. 24 N°2 202602

Recibido: 12/06/2025 / Aceptado: 22/05/2026

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar la sensibilidad de *B. cinerea* aislada del cultivo de fresa frente a tres grupos de fungicidas sistémicos: triazoles (difenoconazole), benzimidazoles (carbendazim) y estrobilurinas (azoxystrobin). A través de un diseño experimental completamente aleatorizado, se analizaron siete concentraciones de cada fungicida sobre el crecimiento micelial y la formación de esclerocios del hongo. La cepa de *Botrytis cinerea* aislada en frutos de fresa en la vereda el Alto se caracterizó por tener colonias redondeadas, de crecimiento rápido, de color gris claro al inicio y gris ratón al final con textura algodonosa y presencias de esclerocios y de anillos concéntricos, que no esporuló en PDA, pero que desarrolló conidióforos y conidios típicos en Agar Fresa. La cepa de *B. cinerea* aislada presentó baja sensibilidad a los tres fungicidas sistémicos estudiados, difenoconazol y axosystrobin con CCL-50 por encima de 10 mg/Lmg/L y, carbendazim por encima de 100 mg/Lmg/L clasificándose frente a los dos primeros como medianamente resistente y frente a carbendazim como altamente resistente, lo constituye una alerta sobre la presencia de fungoresistencia de este patógeno en el cultivo de fresa en la zona de Pamplona.

Palabras clave: crecimiento micelial, esclerocios, triazoles, benzimidazoles, estrobilurinas

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the sensitivity of *B. cinerea* isolated from strawberry cultivation to three groups of systemic fungicides: triazoles (difenoconazole), benzimidazoles (carbendazim) and strobilurins (azoxystrobin). Through a completely randomized experimental design, seven concentrations of each fungicide were analyzed on mycelial growth and sclerotia formation of the fungus. The *Botrytis cinerea* strain isolated from strawberry fruits in the El Alto area was characterized by rounded, fast-growing colonies, initially light gray and later mouse-gray, with a cottony texture and the presence of sclerotia and concentric rings. It did not sporulate on PDA but developed typical conidiophores and conidia on Strawberry Agar. The isolated *B. cinerea* strain showed low sensitivity to the three systemic fungicides studied, difenoconazole and azoxystrobin with LC-50 above 10 mg/Lmg/L and carbendazim above 100 mg/Lmg/L, being classified as moderately resistant to the first two and as highly resistant to carbendazim. This is a warning about the existence of fungal resistance of this pathogen in strawberry crops in the Pamplona area.

Key words: mycelial growth, sclerotia, triazols, benzimidazols, strobilurins

1. INTRODUCCIÓN

La producción de fresas (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) es una actividad agrícola de gran importancia económica en diversas regiones del mundo, incluyendo Colombia, donde se cultiva ampliamente. Sin embargo, este cultivo enfrenta desafíos significativos debido a la presencia de diversos fitopatógenos, entre los cuales destaca *Botrytis cinerea* Whetzel, que causa la enfermedad conocida como moho gris [1].

El impacto económico del cultivo de fresa en Pamplona es considerable, ya que representa una fuente importante de ingresos para numerosos agricultores. Además, la producción de fresa ha generado empleo en la zona, contribuyendo al desarrollo rural y al bienestar de las comunidades locales [2].

El moho gris es una de las enfermedades fúngicas más devastadoras en las plantaciones de fresas en Pamplona, Norte de Santander, por lo que se ha incluido en varias investigaciones. El manejo efectivo de esta enfermedad es esencial para garantizar la viabilidad económica y ambiental de la producción de fresas [3] [4].

El manejo de *B. cinerea* se ha basado tradicionalmente en el uso de fungicidas químicos. No obstante, el uso intensivo y a veces irracional de estos productos ha llevado al desarrollo de cepas resistentes, complicando aún más el control de esta enfermedad. Estudios recientes han demostrado que algunos de los fungicidas más utilizados en el sector fresero de Colombia están perdiendo eficacia debido a la resistencia desarrollada por las cepas de *B. cinerea* [1]. Esta situación subraya la necesidad urgente de evaluar y ajustar las estrategias de manejo de enfermedades para asegurar la sostenibilidad de la producción de fresa en el país.

Estudios realizados en Pamplona han explorado otras alternativas de control debido al uso irracional de fungicidas químicos, sin embargo, estos estudios no han logrado los resultados esperados ni han llevado a la adopción generalizada de nuevas tecnologías por parte de los agricultores [3] [5].

Desde hace algún tiempo se ha estado informando la existencia de fungoresistencia en el cultivo de fresa a *Botrytis cinerea* a fungicidas. En Uruguay se determinó que las poblaciones presentaron resistencia intermedia a carbendazim [6]. En el estado de California USA se reporta resistencia para cuatro ingredientes activos o mezclas de estos como methyl thiophanato, fenhexamid, ciprodinil + fludioxonil y pyraclostrobin + boscalid [7]. En Huelva y Málaga, España, en los años 2014, 2015 y 2016, se observaron altos niveles de resistencia a piraclostrobin y boscalid; como niveles medios para ciprodinil, fenhexamida y pentiopirad; y bajos para iprodiona, fludioxonil, fluopyram y fluxapiroxad. El reporte de aislados de resistencia de *B. cinerea* varios fungicidas confirma ineficacia de estos y justifica la implementación de sistemas de monitoreo a los fungicidas para verificación de resistencia [8].

En México se estudiaron 62 aislados de *B. cinerea* recolectados de frutos de fresas del Valle de Maravatio y del Valle Zamora-Jacona en Michoacán. Para iprodiona hubo diferencias significativas en cuanto a la inhibición micelial entre las distribuciones de sensibilidad de las dos zonas. Para tiofanato-metil, la distribución de sensibilidad fue dispersa y bimodal, con diferencias significativas entre áreas de muestreo [9].

Recientemente, una investigación realizada en Pamplona reportó que tratamientos químicos con carbendazim mostraron buena eficacia contra la mayoría de las enfermedades, excepto contra damping off, y difenoconazole no alcanzó el 60% de eficacia contra la pudrición por *Botrytis*. Este estudio recomendó profundizar en los niveles de sensibilidad a los fungicidas debido a la sospecha de fungo-resistencia [10].

Por lo tanto, surge la siguiente pregunta ¿Cuál será el nivel de sensibilidad que exhibe *Botrytis cinerea* patógeno del cultivo de fresa en la zona de Pamplona al enfrentarlos a fungicidas sistémicos de los principales grupos registrados para el cultivo? Para dar respuesta a esta interrogante la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la posible resistencia de *Botrytis cinerea* aislada del cultivo de fresa en la zona de Pamplona frente a los principales grupos de fungicidas sistémicos recomendados.

2. METODOLOGÍA

Se desarrolló una investigación exploratoria del tipo descriptiva y experimental, siguiendo la clasificación propuesta por [11]. Este enfoque permitió en una primera fase una comprensión profunda de la situación de los fitopatógenos presentes en las áreas cultivadas con fresa en el municipio de Pamplona, en particular la enfermedad del moho gris, y en una segunda fase, llevar a cabo experimentos de laboratorio para evaluar los efectos de diferentes tipos y concentraciones de fungicidas sistémicos sobre el agente causal *B. cinerea*.

La investigación descriptiva permitió caracterizar y documentar una cepa del hongo fitopatógeno *B. cinerea* procedente de una de las veredas cultivadas con fresa a partir de muestreos sistemáticos en los cultivos para coleccionar síntomas, realizar aislamientos e identificar la especie de patógeno referido, y obtener cepas del mismo. Las colectas se realizaron de un cultivo de fresa variedad Albión con 10 meses después de sembradas en la finca Villa Daniela de la vereda Alto grande con coordenadas 7.35505°N y 72.69180°W en el municipio de Pamplona coleccionando frutos con síntomas característicos de *Botrytis cinerea*. Esta fase descriptiva fue fundamental para comprender la gravedad de los problemas fitopatológicos de *Botrytis cinerea* que enfrenta el cultivo de fresa en la región.

Caracterización morfológica de la cepa de *Botrytis cinerea* aislada en el cultivo de fresa en la vereda Alto Grande

Para la obtención de la cepa del hongo *B. cinerea* en el cultivo de fresa se tomaron muestras de frutos con síntomas característicos de la patología, se guardaron en recipientes cerrados y debidamente rotulados y almacenados en cavas refrigeradas siguiendo los protocolos establecidos por el ICA. Las muestras fueron llevadas inmediatamente al Laboratorio de Micología de la Universidad de Pamplona.

Una vez en el laboratorio se llevó a cabo el ingreso de las muestras colectadas en campo (frutos enfermos), luego se inició la preparación de medios de cultivos.

En el laboratorio se tomaron muestras del fruto infectado con un asa, con las cuales se llevaron a cabo diluciones sucesivas en condiciones de esterilidad y se realizaron siembras por agotamiento. Se realizaron las siembras en medio de cultivo artificial Agar agua y Agar Ogye, recomendados según protocolos estandarizados para el diagnóstico de hongos [12].

Para el aislamiento inicial Se empleó el medio de cultivo Agar Agua y Agar Ogye. Después del aislamiento se hicieron en medios específicos enriquecidos, como PDA y Agar Fresa medios en que se realizaron las descripciones morfológicas del patógeno. Generalmente los ingredientes de los medios de cultivo se disuelven agitando y calentándolos ligeramente en agua destilada, durante 1 minuto para conseguir que se disuelvan, sin embargo, se debe evitar sobrecalentarlos innecesariamente. Luego de la disolución se procede a la esterilización del medio, la cual fue por autoclavado, donde se expone durante 15 minutos a 121°C, la filtración en la cual se filtra a través de una membrana de acetato de celulosa o nitrocelulosa de un poro de 0,22 µm y por último la tindalización donde se expuso a 100 °C durante 30 minutos [12] [13].

Las placas con las siembras se incubaron durante 10 días a una temperatura de 25°C. La cepa fue revisada y certificada según su conservación y pureza. La identificación del hongo patógeno se realizó por las características morfológicas con el empleo de claves generales de Agrios [12] [14].

Caracterización morfológica

La descripción del hongo se hizo mediante observación macroscópica y microscópica de sus estructuras, se realizó una tinción o coloración, de acuerdo con el siguiente procedimiento [15].

Para la clasificación de la textura, color, hábitos y forma de crecimiento de las colonias se tuvieron en cuenta las recomendaciones dadas por [16] y [17]. Se obtuvo el registro fotográfico de las estructuras somáticas, así como el tipo de crecimiento de la colonia, coloración, textura, etc.

Determinación de la inhibición micelial y CL-50 de *B. cinerea* frente a tres fungicidas.

Se desarrollaron tres experimentos a nivel de laboratorio con tres fungicidas pertenecientes a tres familias químicas: difenoconazole del grupo de los triazoles, carbendazim del grupo de los benzimidazoles y azoxystrobin del grupo de las estrobirulinas. Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado, para cada uno de los fungicidas, una elección que se fundamenta en su capacidad para proporcionar una distribución uniforme y equitativa de los tratamientos, lo que garantiza la aleatoriedad y la validez de los resultados obtenidos [11].

El diseño para cada experimento fue del tipo 8x4 (siete concentraciones de cada fungicida + un testigo vs la cepa del fitopatógeno con cuatro repeticiones en placas de Petri). Este enfoque permitió explorar una gama variada de concentraciones para cada fungicida, lo que posibilita una evaluación completa de su efectividad en el control del hongo fitopatógeno. Además, la inclusión de un grupo testigo sin tratamiento proporcionó una referencia útil para comparar y evaluar la eficacia relativa de los fungicidas utilizados.

Por lo tanto, se utilizaron un total de 8 tratamientos por cada fungicida (7 concentraciones más un testigo) considerando cuatro repeticiones por tratamiento, se establecieron un total de 32 unidades experimentales (placas de Petri) por cada ensayo. Esta cantidad de repeticiones garantiza la robustez estadística de los resultados, al permitir una evaluación precisa de la variabilidad y la consistencia de los efectos observados en cada tratamiento [18].

Los tratamientos para cada enfrentamiento de cada fungicida vs patógeno a evaluar fueron los siguientes (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de cada uno de los fungicidas (difenoconazole, carbendazim y azoxystrobin) que se utilizaron como tratamientos en cada experimento, así como la cantidad de cada solución madre a emplear y la cantidad de agar - fresa a emplear [19].

Tratamientos de cada fungicida	Concentración del fungicida (mg/L)	Cantidad de la solución estándar de cada Fungicida	Cantidad de agar - fresa (ml)
T1 (Testigo Absoluto)	0	-	100
T2	0,001	1 mL de S4	99,0
T3	0,01	5 mL de S3	95,0
T4	0,1	2 mL de S3	98,0
T5	0,5	1 mL de S2	99,0
T6	5	1 mL de S1	99,0
T7	10	2 mL de S1	98,0
T8	100	20 mL de S1	80,0

Fuente: elaboración propia

Preparación de las soluciones madre

Los formulados fungicidas empleados fueron Conazole 250 EC de ingrediente activo difenoconazole perteneciente al grupo de los triazoles, Carbendazim 500 SC de ingrediente activo carbendazim del grupo de los benzimidazoles y Chakal 250 SC de ingrediente activo azoxystrobin del grupo de las estrobirulinas.

Antes de establecer los tratamientos con las concentraciones de los fungicidas se prepararon cinco soluciones madres (S1, S2, S3 y S4) que permitieron establecer las proporciones en los medios de cultivos para obtener la concentración deseada. El procedimiento para la obtención de estas soluciones madre se explica a continuación. La cantidad de solución madre de cada fungicida preparada dependió de la cantidad de muestras. Se empleó como disolvente agua. La solución final y la cantidad de fungicidas preparado se calculó a partir del siguiente procedimiento [19]:

Las diluciones a preparar en el Agar-Fresa para lograr las diferentes concentraciones de los fungicidas (se usó un agar de alta pureza para lograr buen rigor al comparar los resultados) fueron las recomendadas por el Manual de la FAO [19].

Las soluciones de fungicidas se agregaron al agar del Erlenmeyer en el momento que estaban completamente derretido y lo suficientemente fresco para conservarlo en la mano (aprox 40°C). Después de agregar la solución fungicida, se agitó suavemente el agar para permitir la homogeneización del fungicida, cuidando de evitar la formación de burbujas. Entonces el contenido de cada concentración se vierte en cuatro placas de Petri (repeticiones). Las placas se mantuvieron en una mesa de laboratorio a temperatura ambiente hasta su solidificación. Después de sembradas se incubaron a temperatura ambiente.

Sistema de variables:

Variables independientes: Diferentes concentraciones de cada fungicida sistémicos representante de los grupos triazoles, benzimidazoles y estrobirulinas utilizados sobre el hongo fitopatógeno aislado del cultivo de fresa.

Variables controladas: Medios de cultivo, temperatura y humedad relativa

Variables dependientes:

- Inhibición micelial
- Número de esclerocios / placa.

Inhibición micelial:

Se colocaron discos de micelio del fitopatógeno 1 cm de diámetro en el centro de las placas de cada experimento. Se midió el diámetro de la colonia en cm de forma perpendicular dos veces, y con los datos promedio de las dos mediciones se calculó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula Abbott [20].

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{crecimiento colonia testigo} - \text{crecimiento colonia concentración})}{\text{crecimiento colonia testigo}} \times 100$$

En cada experimento se hicieron mediciones a las unidades experimentales diariamente hasta el décimo día después de haber colocado el disco de micelio del patógeno.

Efecto sobre el desarrollo de esclerocios

Para medir el efecto de los fungicidas sobre el desarrollo de los esclerocios se realizó un recuento del número de esclerocios por placa a los 20 días de la siembra del hongo en cada experimento, donde se determinó el número de esclerocios desarrollados por placa. Este conteo se realizó de forma visual usando una lupa de conteo de colonias para tener precisión en el conteo.

Análisis estadístico

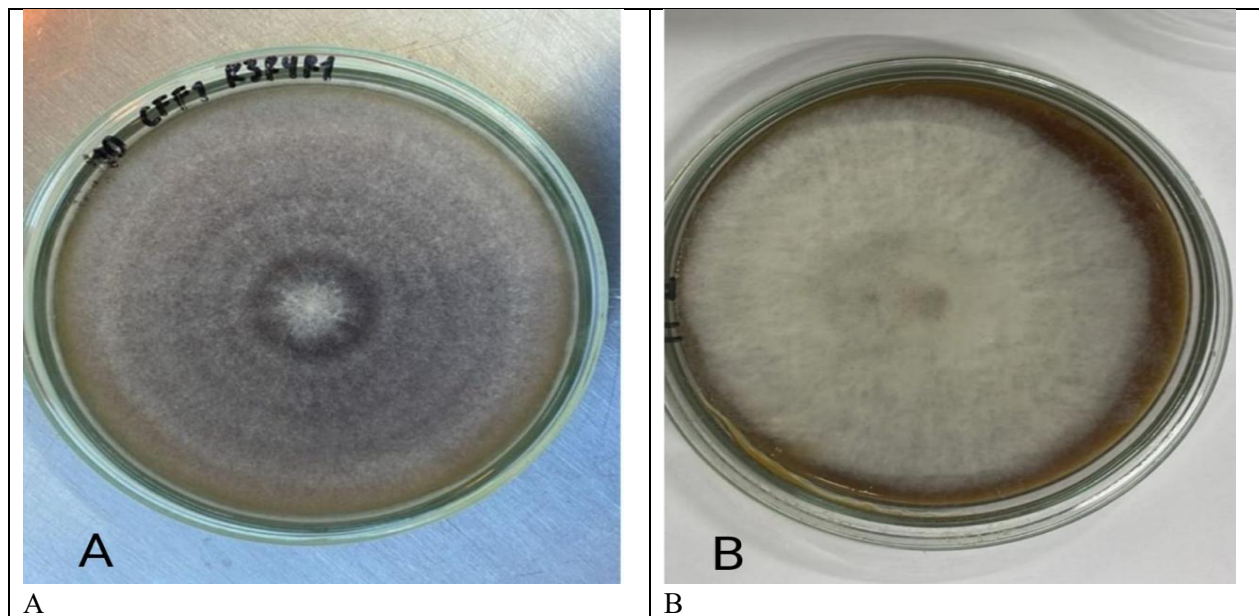
Una vez obtenidos los datos de diámetro de las colonias y de conteo de esclerocios se realizaron los análisis estadísticos. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y cuando este se mostró significativo ($p < 0,05$), se aplicó una prueba de comparación de media de Tukey con un nivel de significancia del 95 %. Se empleó el paquete SPSS versión 23.

Se determinaron los valores de CL-50 según la curva dosis del fungicida/porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo, y fungicida/inhibición según tiempo del experimento para lo cual se trabajó con un nivel de probabilidad de error del 5%. Los datos de inhibición fueron transformados a unidades probit, las concentraciones a logaritmos de concentración, y se calcularon las CCL50 para cada fungicida frente a la cepa del patógeno. Se hizo un análisis de correlación de Pearson y una prueba de regresión. haciendo transformación de los datos al software Probit desarrollado para este fin por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal de Cuba (INISAV) [19]. Para determinar el nivel de susceptibilidad a cada fungicida se tuvo en cuenta los criterios de [21].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de la enfermedad fueron más visibles en los frutos en condiciones húmedas y frescas, donde el hongo formaba una característica capa de moho gris en las áreas infectadas, lo que permitió el reconocimiento de la enfermedad en campo. En los frutos seleccionados y llevados a laboratorio se evidenció principalmente manchas, moho y malformaciones. Las fresas presentaban coloraciones marrones, acompañadas de una textura blanda que con el avance llegaba a cubrir de moho gris toda la superficie del fruto y en donde algunas veces tenía evidencia del inicio de una desintegración evidente en el fruto, descripciones de los síntomas y signos que coincidían con las realizadas por [22].

Las colonias de *B. cinerea* se caracterizaron por tener forma redondeadas, de color gris claro al inicio y gris ratón al final. Tanto en PDA como Agar Fresa las colonias mostraron velocidad de crecimiento rápido a moderado (invasivo), entre 8 y 10 día cubría la placa de 9 cm. Las colonias eran filamentosas, con textura, algodonosa con presencia de esclerocios en ambos medios y con presencia de anillos, más visibles en PDA. El hongo no esporuló en PDA, pero si en Agar Fresa.



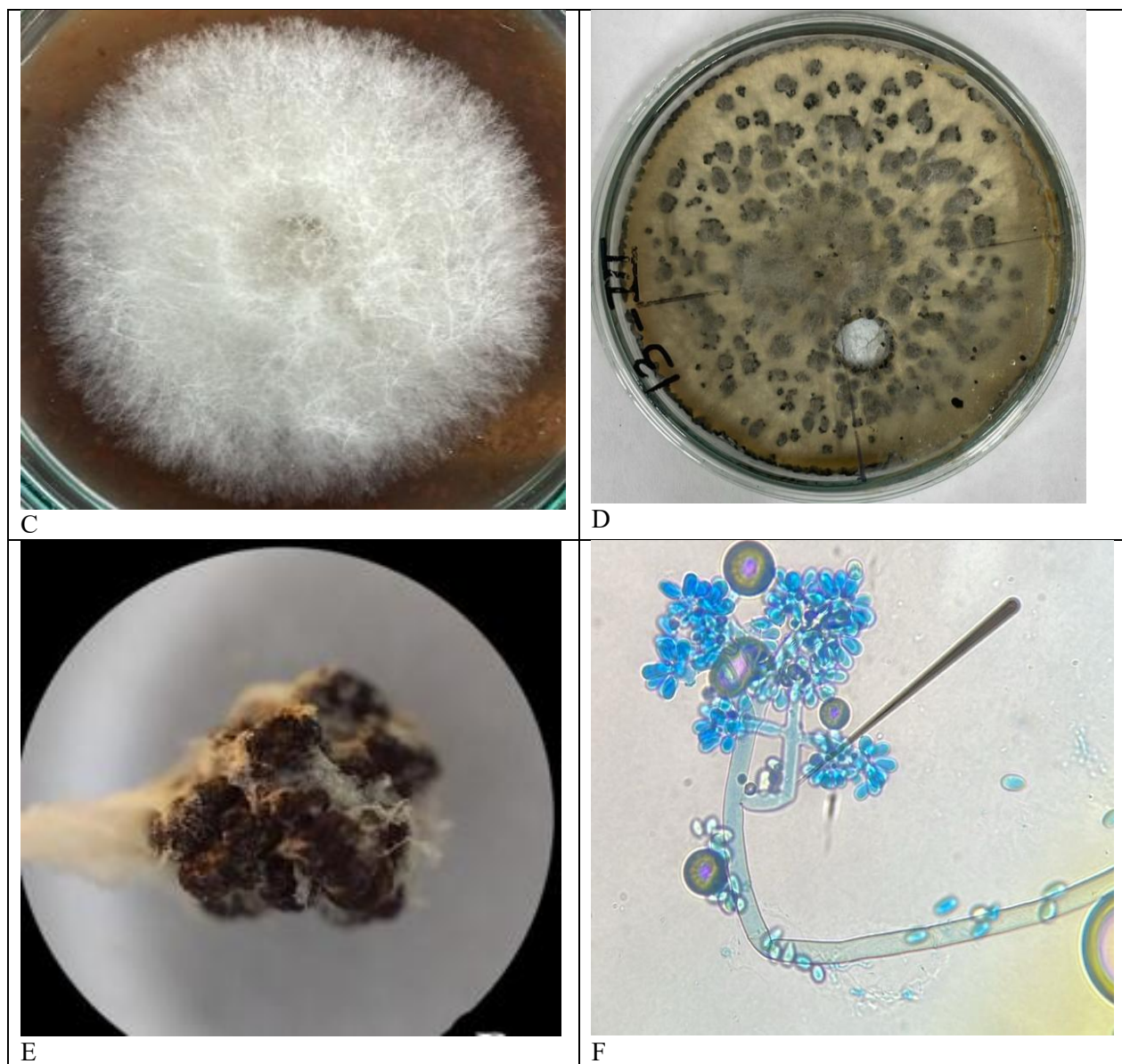


Figura 1. Forma de las colonias de *B. cinerea* en diferentes medios de cultivo, A. medio de cultivo PDA y B. medio de cultivo Agar-Fresa. C. Textura algodonosa típica en Agra Fresa; D. Colonia con presencia de esclerocios. E. Esclerocios observados bajo el estereoscopio F. Conidios y conidióforos de *B. cinerea* desarrolladas en Agar Fresa visto bajo el microscopio. Fuente: elaboración propia.

Determinación de la inhibición micelial y CL-50 de *B. cinerea* frente a los tres fungicidas.

El resultado del ANOVA para para la comparación del crecimiento radial de las colonias en las diferentes concentraciones de los fungicidas reflejó diferencia estadística entre los tratamientos ($p < 0,05$) para difenoconazole a los 6 como a los 8 días de haber iniciado el ensayo, no mostró diferencia estadística para carbendazim a los cinco días, pero si a los ocho, mientras que para azoxystrobin se evidenció diferencia estadística entre los tratamientos tanto a los cinco como a los ocho días de iniciado el ensayo. La comparación de medias a los seis días evidenció que el mayor diámetro de la colonia era para el testigo (6,30cm) (a) sin

diferencia estadística ($p < 0,05$) con los de las concentraciones de 0,001mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L 5 y 10 mg/L, pero si con el tratamiento de 100 mg/L (b), el cual no se diferenció de los tratamientos con 5 y 10 mg/L. A los 8 días de iniciado el ensayo el diámetro promedio de la colonia del testigo (9 cm) (a), no se diferenciaba estadísticamente ($p < 0,05$) con los de las concentraciones de 0,001mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L 0,5 mg/L y mg/L 5, pero sí de los tratamientos con 10nctraciones de 10 y 100 mg/L, mientras que este último se diferenciaba del resto, pero no del de 10 mg/L y el de 5 mg/L, no se diferenciaba del de 10 mg/L (Tabla 3).

Tabla 2. Resultado del análisis estadístico para la comparación del crecimiento radial de las colonias en las diferentes concentraciones de los fungicidas

Resultado del ANOVA							
		Difenoconazole		Carbendazim		Azoxystrobin	
		Seis días	Ocho días	Cinco días	Ocho días	Cinco días	Ocho días
Valor F		6,000	15,919	1,907	17,299	36,607	17,629
P valor		0,000	0,000	0,113	0,000	0,000	0,000
Comparación de medias							
Tratamientos	(mg/L)	Diámetro (cm)					
T1	0	6,30 a	9,00 a	5,23 a	9,00 a	7,06 a	9,00 a
T2	0,001	6,85 a	8,12 a	5,25 a	8,12 ab	6,62 ab	9,00 a
T3	0,01	7,12 a	9,00 a	5,47 a	7,93 abc	5,81 ab	9,00 a
T4	0,1	6,20 a	8,5 a	4,17 a	6,91 bcd	5,45 b	8,43 ab
T5	0,5	5,60 a	7,95 a	4,33 a	6,78 bcd	3,87 c	8,06 bc
T6	5	5,25 ab	6,8 ab	4,46 a	6,58 bc	3,937 c	7,87 bc
T7	10	4,42 ab	5,52 bc	4,26 a	6,43 c	2,43 d	7,25 c
T8	100	2,67 b	3,55 c	2,51 a	4,80 e	2,93 d	7,25 c
ET	0,50	0,49	0,680	0,307	0,283	0,177	
CV (%)	18,26	13,28	30,51	8,69	11,89	4,03	

*. Medias con letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$, según la prueba de Tukey. Fuente: elaboración propia

La comparación de medias para el carbendazim a los ocho días evidenció el mayor diámetro de la colonia para el testigo (9,0 cm) (a) sin diferencia estadística con los de las concentraciones de 0,001mg/L, 0,01 mg/L, pero si con el resto de los tratamientos. El tratamiento a 100 mg/L (e) evidenció el menor diámetro de la colonia con diferencia estadística ($p < 0,05$) con el resto. En segundo lugar, desde el punto de vista estadístico ($p < 0,05$) en relación al menor tamaño de las colonias correspondió para el tratamiento con 10 mg/L (c), pero que no se diferenció de los tratamientos con los de las concentraciones de 0,01 mg/L, 0,1 mg/L 0,5 mg/L y mg/L.

La comparación de medias para el azoxystrobin a los cinco días mostró que el diámetro de la colonia mayor correspondía al testigo (7,06 cm) (a) sin diferencia estadística ($p < 0,05$) con los de las concentraciones de 0,001mg/L y 0,01 mg/L, pero si con el resto de los tratamientos. Los tratamientos con el tamaño menor de las colonias fueron los de las concentraciones de 10 y 100 mg/L (d). En segundo lugar, desde el punto de vista estadístico ($p < 0,05$) en relación al menor tamaño de las colonias correspondió para los tratamientos con 0,5 y 5 mg/L (c) los cuales se diferenciaron del resto de los tratamientos. A los ocho días de iniciado el ensayo el diámetro promedio de la colonia del testigo (9 cm) (a), no se diferenciaba estadísticamente ($p < 0,05$) con los de las concentraciones de 0,001mg/L, 0,01 mg/L, y 0,1 mg/L, pero si del resto de los tratamientos. Los tratamientos con el tamaño menor de las colonias fueron también para los de las concentraciones de 10 y 100 mg/L (c), pero que no se diferenciaron de los tratamientos con los de 0,5 y 5 mg/L. Es importante resaltar que tanto el tratamiento testigo, como los de 0,001mg/L y 0,01 mg/L, el hongo cubrió totalmente las placas (9,0 cm), lo que da una medida del poco efecto del fungicida.

Una vez realizada la transformación de inhibiciones en logit y las concentraciones en log, el análisis de regresión permitió obtener para el caso del difenoconazole la ecuación lineal $Y=1,054x+3,846$ con un ajuste significativo de los datos. Por medio de esta se estimó 46,06 mg/L como la CL-50 de *B. cinerea* para difenoconazole. El análisis de regresión para el carbendazim permitió obtener la ecuación lineal $Y=0,2211x+4,3417$ con un ajuste significativo de los datos. Por medio de esta se estimó 855,85 mg/L como la CCL-50 de *B. cinerea* para este fungicida. El análisis de regresión para los datos de inhibición del azoxystrobin permitió obtener la ecuación lineal $Y=0,95x+3,1143$ con un ajuste significativo de los datos, con la cual se estimó como una CL-50 de 96,21 mg/L para el patógeno frente a este fungicida (Tabla 4).

Tabla 3. Determinación de los valores de CL-50 para *B. cinerea* según la curva dosis de los fungicidas /porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo.

Difenoconazole				CL50 (mg/L)		
Ecuación	X ² *	R	R ²	Cal.	L inf.	L. sup.
$Y=1,054x+3,846$	4,85	0,90	0,81	46,06	38,57	52,27
Carbendazim				CL50 (mg/L)		
$Y=0,2211x+4,3417$	0,086	R=0,95	R ² =0,91	855,85	889,82	881,89
Azoxystrobin				CL50 (mg/L)		
$Y=0,95x+3,1143$	4,04	0,88	0,77	96,21	74,18	118,25

*. No diferencia estadística por la prueba de X². Fuente: elaboración propia

Efecto de los fungicidas sobre la producción de esclerocios

El análisis estadístico del efecto sobre la producción de esclerocios en las placas de los tratamientos con los tres fungicidas arrojó efecto significativo ($p<0,05$) en resultado del ANOVA de iniciado el ensayo arrojó efecto significativo ($p<0,05$) en resultado del ANOVA. La comparación de medias para difenoconazole a los 25 días evidenció que el mayor número de esclerocios correspondía para las colonias del testigo (255, 00) (a) sin diferencia estadística ($p<0,05$) con los de las concentraciones de 0,001mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L y 0,5 mg/L, pero si de los tratamientos con concentraciones de 5 y 10 y 100 mg/L. El menor número de esclerocios se presentó en el tratamiento con 100 mg/L, pero sin diferencia estadística significativa con los de 5 y 10 mg/L., mientras que los dos últimos no se diferenciaron de los tratamientos con 0,1 y 0,5 mg/L (Tabla 5).

Tabla 5. Resultado del análisis estadístico para la comparación del número de esclerocios en las placas para las diferentes concentraciones de azoxystrobin.

Resultado del ANOVA				
Valor F		10,79	13,391	135,74
P valor		0,113	0,000	0,00
Comparación de medias		Número de esclerocios /placa		
Tratamientos	Concentración (mg/L)	25 días	20 días	20 días
T1	0	255, 00 a	141,00 a	101,0 a
T2	0,001	229,25 a	105,25 ab	101,5 a
T3	0,01	233,25 a	102,00 abc	35,25 b
T4	0,1	161,75 abc	88,75 bc	22,25 bc
T5	0,5	187,00 ab	55,25 cd	12,25 cd
T6	5	112,00 bc	61,00 bcd	7,0 cd
T7	10	103,00 bc	64,75 bcd	0,25 d
T8	100	83,50 c	21,25 d	0,25 d
ET		0,307	0,25	0,21
CV (%)		8,80	10,11	3,65

*. Medias con letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0,05$, según la prueba de Tukey. Fuente: elaboración propia.

La comparación de medias para carbendazim a los 20 días evidenció que el mayor número de esclerocios se presentaba para las colonias del testigo (141, 00) (a) pero sin diferencia estadística ($p < 0,05$) con dos tratamientos, (0,001 mg/L, 0,01 mg/L), pero sí de los tratamientos con concentraciones de 0,1, 0,5, 5 y 10 y 100 mg/L. El menor número de esclerocios se presentó en el tratamiento con 100 mg/L, pero sin diferencia estadística significativa con otros tres tratamientos (0,5, 5 y 10 mg/L), esto da una idea de que a pesar de las diferencias varios tratamientos de concentraciones altas eran similares estadísticamente y varios tratamientos de concentraciones bajas también.

La comparación de medias para azoxystrobin a los 20 días reflejó que el mayor número de esclerocios correspondía para las colonias del testigo y el tratamiento T1 (0,001 mg/L) (101,0 y 101,5 respectivamente) (a) con diferencia estadística ($p < 0,05$) con el resto de los tratamientos. El menor número de esclerocios se presentó en el tratamiento con 100 y 10 mg/L, con 0,25 esclerocios cada uno, los cuales no difirieron estadísticamente de los tratamientos con 0,5 y 5 mg/L, pero si con los demás tratamientos. Como se observa el número de esclerocios fue menos en los tratamientos desde 0,5 a 100 mg/L.

Los resultados demuestran baja sensibilidad de la cepa de *B. cinerea* aislada en la vereda Alto Grande a los tres fungicidas de los tres grupos o familias a químicas estudiadas. Teniendo en cuenta la clasificación de las cepas de hongos a fungicidas sistémicos propuesta por [21] (las cepas inhibidas con valores de CL50 < 10 mg/L se consideran susceptibles, las cepas inhibidas con valores de CL50 de 10 a 100 mg/L se consideran resistentes intermedias y los aislados con CL50 valores mayores de 100 mg/L como altamente resistente), se puede considerar que la cepa estudiada es altamente resistente frente a carbendazim y medianamente resistente frente a difenoconazole y azoxystrobin.

Los resultados obtenidos se adicionan a los de baja sensibilidad con riesgos de fungoresistencia informados internacionalmente para *Botrytis cinerea* en el cultivo de fresa en Uruguay [6] en el estado de California USA [7], en España [8] y en México [9].

Los resultados muestran que difenoconazole tiene una efectividad limitada para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* en bajas concentraciones, mientras que las concentraciones más altas (10-100 mg/L) producen una mayor inhibición micelial. La CL-50 de 46,06 mg/L evidencia una resistencia significativa del hongo, lo que plantea preocupaciones sobre su eficacia en condiciones de campo. Esto se alinea con otros estudios que documentan la aparición de resistencia en *B. cinerea* debido al uso prolongado de fungicidas triazoles como según [23] que evaluó *B. cinerea* en cultivos de arándano y encontró perfiles de resistencia variados dependiendo del fungicida, siendo los triazoles menos efectivos que los SDHI. Aunque difenoconazol mostró cierta efectividad, este estudio confirma que altas concentraciones son necesarias, algo que no siempre es viable en condiciones de campo.

La capacidad limitada del difenoconazole para inhibir el crecimiento a bajas concentraciones refleja una adaptación del hongo. Esto puede ser consecuencia de mutaciones en el gen *cyp51* o del uso continuo de fungicidas con modos de acción similares, un patrón ya señalado en la literatura [23] [24].

Según el listado de plaguicidas permitidos por el ICA [26] se encuentra registrado difenoconazole (CANCILLER® 25 EC) recomendado para el cultivo de fresa, pero de acuerdo a la situación detectada en este estudio este es un ingrediente activo que no debe usarse en los cultivos de fresa de Pamplona.

El estudio demuestra que carbendazim tiene una efectividad limitada para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* desde concentraciones bajas. A pesar de que la inhibición micelial aumenta con la concentración del fungicida, no supera el 46,67 % a 100 mg/L, concentración más alta probada. La CL-50 estimada de 855,85 mg/L evidencia una alta tolerancia del hongo, lo que sugiere un grado avanzado de resistencia al carbendazim en la cepa analizada. Este comportamiento podría atribuirse a adaptaciones genéticas, como mutaciones en el gen *tub2*, que codifica la β -tubulina, principal sitio de acción de los benzimidazoles [24].

Los resultados se corresponden con los de [25] que evaluaron la sensibilidad de *B. cinerea* en manzanos y observaron que este patógeno presentaba variaciones regionales significativas en su sensibilidad a este grupo

de fungicidas y se atribuyó a que los benzimidazoles, como el carbendazim, actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina, lo que interfiere en la formación de microtúbulos durante la división celular por lo que la exposición prolongada y frecuente a estos compuestos ha llevado al desarrollo de cepas resistentes.

Según el listado de plaguicidas permitidos por el ICA [26] se encuentran numerosos productos químicos registrados de ingrediente activo carbendazim, como ejemplo de algunos de ellos está CARBENDAZIM 500 SC AGRICENSE producto usado para esta investigación, EVOZIM 500 SC y FORDAZIM® 500 SC recomendados para el cultivo de fresa y de acuerdo a la situación detectada en este estudio este es un ingrediente activo que no debe usarse en los cultivos de fresa de Pamplona.

Al comparar los resultados para azoxystrobin con los de [25], se observa que reportaron CL-50 más bajas, lo que demuestra la variabilidad en la sensibilidad de *B. cinerea* según el contexto agrícola y la intensidad del manejo químico y sugiere que las estrategias de control deben adaptarse a las características específicas de cada cultivo y región.

La resistencia de *B. cinerea* a fungicidas como difenoconazole, carbendazim y azoxystrobin representa un desafío significativo en la producción de fresa. Los resultados de este estudio sugieren que esta resistencia está vinculada al uso prolongado e inadecuado de fungicidas en el cultivo de fresa en la zona de Pamplona, lo que ha llevado a adaptaciones genéticas del hongo, reduciendo su efectividad y favoreciendo la selección de cepas resistentes.

El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) regula el uso de plaguicidas en Colombia, incluyendo los fungicidas registrados para el manejo de *B. cinerea*. Según el registro ICA [26], se ha incrementado la oferta de mezclas de ingredientes activos como las combinaciones de triazoles y estrobirulinas. Entre las mezclas de estos productos sistémicos se pueden mencionar varios formulados: azoxystrobin + difenoconazol (AMISTAR TOP 50 SC, STRONG TOP® SC, AZOCONOLE AVGUST 325 SC, TIAGO GOLD 250 SC, HELMSTAR PRISMA® 325 SC y FEUDAL ®TOP 200 SC) y las combinaciones de triazoles con benzimidazoles formulados: carbendazim + tebuconazole (TANDEM 250 SC y QUON DUO 375 SC) [26], sin embargo, estas mezclas no serían eficaces en las condiciones de Pamplona.

Se plantea que la efectividad de los fungicidas sistémicos depende del cumplimiento estricto de los lineamientos técnicos y la rotación adecuada según los códigos FRAC [27], sin embargo, aunque las mezclas de fungicidas sistémicos ofrecen una herramienta valiosa, no siempre puede ser efectiva como se ha puesto en evidencia en este trabajo por la baja sensibilidad del patógeno a los tres grupos de fungicidas estudiados, por lo que el monitoreo constante de la sensibilidad de *B. cinerea* es clave para ajustar las estrategias de control según los niveles locales de resistencia como se demuestra en este estudio, aunque deben continuarse los estudios con otras cepas de otras veredas.

Es importante seguir investigando con los antagonistas *Trichoderma* y *Bacillus* spp. para el manejo de la pudrición gris ya que informan resultados alentadores con productos comerciales y pre comerciales contra esta enfermedad en el cultivo de fresa en Pamplona [10].

4. CONCLUSIONES

1. La cepa de *Botrytis cinerea* aislada en frutos de fresa en la vereda el Alto se caracterizó por tener colonias redondeadas, de crecimiento rápido, de color gris claro al inicio y gris ratón al final con textura algodonosa y presencias de esclerocios y de anillos concéntricos de diferentes tonalidades, que no esporuló en PDA, pero que desarrolló conidióforos y conidios típicos en Agra Fresa.

2. El micelio de la cepa de *Botrytis cinerea* aislada presentó baja sensibilidad a los tres fungicidas sistémicos estudiados difenoconazol y axosystrobin con CCL-50 por encima de 10 mg/L y, carbendazim por encima de 100 mg/L clasificándose frente a los dos primeros fungicidas como medianamente resistente y frente a carbendazim como altamente resistente, lo constituye una alerta sobre la existencia de fungo resistencia de este patógeno en el cultivo de fresa en la zona de Pamplona.

3. De forma general se observó efecto significativo de los tres fungicidas sobre la producción de esclerocios, pero en las cuatro concentraciones más altas siempre se producían estas estructuras y no se presentaban diferencias estadísticas entre esos tratamientos, y para carbendazim y difenoconazole en varias concentraciones bajas (de 0,001 a 0,1 mg/L) no se manifestaba efecto significativo sobre el número de esclerocios con relación al testigo.
4. Realizar investigaciones adicionales para evaluar la sensibilidad de *Botrytis cinerea* frente a otros fungicidas sistémicos y no sistémicos, así como realizar ajustes de estrategias de manejo integrado de esta enfermedad incorporando las medidas anti fungoresistencia más adecuadas incluso con la incorporación de antagonistas biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. J. O. Escarraga-Triana. Caracterización de la enfermedad “Moho Gris” (*Botrytis cinerea*) y la resistencia a los fungicidas más utilizados en el sector fresero de Colombia. 2021. <https://repositorio.ucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/3800>
- [2] C.A. Gualdrón-Guerrero, B.A. Maldonado-Gómez, D.R. Espitia-Velandia, J.N. García Serrano. Aproximación al caso de desarrollo local de la zona rural del municipio de Pamplona. *FACE: Revista de la Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales*, 17 (2), 142–156. 2017. <https://doi.org/10.24054/face.v17i2.543>
- [3] H. Vega, L. Castellanos, N. Céspedes, A. Sequeda. Control alternativo de las enfermedades fúngicas foliares en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en el municipio de Pamplona, Norte de Santander: *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4 (1), 10-21. 2019.
- [4] L.C. González, A.F.B. Sanjuán. Enfermedades foliares más importantes del cultivo de la fresa en la zona de pamplona. *Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo*, 12 (1), 15-25. 2021. http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/bitstream/20.500.12744/1804/1/Baldovino_2017_TG.pdf
- [5] L. Castellanos, A. Baldovino, N. Céspedes, X. Rivera. Biopreparados para el control de enfermedades foliares de fresa, Pamplona, Colombia, aun una solución parcial. *JONNPR*. 5 (9), 933-51. 2020. <https://doi.org/10.7440/res64.2018.03>
- [6] V. Gepp, S. Vero, M.E. Cassanello, G. Romero, E. Silvera, P. González, J. Rebellato, Y. Ferreira, O. Bentancur. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia - Sitio En Reparación*, 16 (1), 97–107. 2012. <https://doi.org/10.2477/vol16iss1pp97-107>
- [7] S.T. Koike, M. Bolda. El Moho Gris, o Pudrición de Fresa. UC Cooperative Extension. Publicación # 13. 2016. <https://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>
- [8] D. Fernández-Ortuño, A. Pérez-García, J. Torés-Montosa, A. de Vicente, Resistencia a múltiples fungicidas en “*Botrytis cinerea*” en fresa. *Agrícola Vergel: Fruticultura, Horticultura, Floricultura*, 405, 327–330. 2017. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6206090>
- [9] A. Álvarez-Medina, H.V. Silva-Rojas, S. G. Leyva-Mir, N. Marbán-Mendoza, Á. Rebollar-Alviter. Resistencia de *Botrytis cinerea* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) a fungicidas en Michoacán México. *Agrociencia*, 51 (7), 783-798. 2017.
- [10] Y. Rodríguez, N. Osorio, L. Castellanos, Y. Pérez. Antagonistas comerciales para el manejo de enfermedades fúngicas del cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 4 (1), 1-14. 2024.
- [11] R. Hernández, C. Mendoza. "Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta." McGraw Hill México. 2018.
- [12] G.N. Agrios. *Plant Pathology*. Elsevier. 2005.
- [13] Cultimed. *Manual Básico de Microbiología*. Panreac Química S.A. 4° edición. 2003.
- [14] G.V. Pallares-Castro. Validación del método analítico para diagnosticar *Botrytis cinerea* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG, y el aseguramiento de la calidad del ensayo mediante análisis

- genético. Tesis de ingeniería, Universidad Politécnica Salesiana. Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana. 2023.
- [15] V. Cañedo, T. Ames. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center. 2004.
- [16] R. Marquez. *Micología- Microbiología ambiental*. 8-9. 2017.
- [17] G. Estrada, M. Ramirez. *Micología general*. Universidad catolica de manizales. 2019. <https://www.ucm.edu.co/micologia-general/>
- [18] D.C. Montgomery. *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons. 2017.
- [19] L. Pérez-Vicente. Manual on fungicides and fungicide resistance monitoring in banana. TCP-SLC-3402 Project-Development of Integrated Programmes and Action Plans for Black Sigatoka Disease Management in five countries of the Caribbean. 2013. <http://www.fao.org/3/a-as125e.pdf>
- [20] Ciba-Geigy. *Manual para ensayos de campo en proteccion vegetal*. 2da Edición revisada y ampliada. Basilea, Suiza. 1981. 205p.
- [21] C. Torres, R. Tapia, I. Higuera, R. Martin, A. Nexticapan, D. Pérez. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole resistant isolates. *Plant Disease*, 99 (11), 1590-1595. 2015.
- [22] M. Granados. Principales grupos de organismos considerados como “hongos” fitopatógenos y principales estructuras útiles en su identificación. Identificación morfológica de “hongos fitopatógenos”. Universidad de Costa Rica, Vicerrectoría de Acción Social. 2018. https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/hanCLe/10669/79022/Manual_hongos_y_key_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [23] J.S. Salazar-Cotera. Perfil de resistencia de *Botrytis cinerea* a diferentes fungicidas durante una campaña de arándano (*Vaccinium corymbosum*). 2024. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/home>
- [24] Pucci, G. (2020). TP 9 Micología. Microbiología ambiental. Universidad nacional de la patagonia Juan Bosco. <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2020/03/TP-9-Micolog%C3%ADa.pdf>
- [25] G.E. Lobos-Norambuena, M. Lolas-Caneo, M.P. Cáceres Pinto, M. P. Evaluación in vitro de la sensibilidad de *Botrytis cinerea* a fungicidas utilizados en el control químico de *Venturia inaequalis* en manzanos (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía.). 2014. http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/10020/2/lobos_norambuena.pdf
- [26] Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Registros nacionales de plaguicidas al 30 de abril de 2024. 2024. https://www.ica.gov.co/getdoc/4f5eba46-6f63-4fe1-a63a-5397da9797b4/9-bd_registros-nacionales-plaguicidas_30-de-abril.aspx
- [27] M. Ortiz. ¿Es posible eliminar la resistencia a fungicidas?. Redagricola. 2022. <https://redagricola.com/es-posible-eliminar-la-resistencia-a-fungicidas/>