



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Maestría en Ciencias en Protección Vegetal

Sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. obtenidos de fresa a fungicidas de diferente modo de acción

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Protección Vegetal



Presenta

Ana María Aguilera Blanco

Bajo la supervisión de:

Ángel Rebollar Alviter, PhD.



Chapingo, Estado de México, junio de 2023

**Sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp.
obtenidos de fresa a fungicidas de diferente modo de
acción**

Tesis realizada por **Ana María Aguilera Blanco** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL:

DIRECTOR:



MC. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ix
AGRADECIMIENTOS	x
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	xiv
JUSTIFICACIÓN	xvii
OBJETIVOS.....	xviii
Objetivos específicos:	xviii
HIPÓTESIS.....	xix
CAPÍTULO I.....	1
1.1 REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1.1 Mancha foliar, pudrición de raíz y corona por <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	1
1.1.2 Taxonomía de <i>Neopestalotiopsis</i>	3
1.1.3 Morfología de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	3
1.1.4 Rol ecológico y ambiental de <i>Neopestalotiopsis</i>	4
1.4.1.1 Especies de <i>Neopestalotiopsis</i> como endófitos	5
1.1.5 Importancia del género <i>Neopestalotiopsis</i> como fitopatógeno.....	6
1.1.6 Hospedantes de <i>Neopestalotiopsis</i> y <i>Pestalotiopsis</i>	7
1.1.7 Importancia económica	9
1.1.8 Manejo de las enfermedades causadas por <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en fresa	10
1.1.9 Modo de acción de fungicidas	11
1.1.10 Resistencia a fungicidas	13
1.1.10.1 Mutación puntual.....	15
1.1.10.1 Mutación puntual en fungicidas QoI	15
1.1.10.3 Mutaciones puntuales en fungicidas SDHI	16
1.1.10.4 Mutaciones puntuales por fungicidas DMI.....	17
1.1.10.5 Mutaciones puntuales en fungicidas MBC	17
1.1.11 Métodos de monitoreo de resistencia a fungicidas	18
1.1.11.1 Dosis discriminadora.....	19

1.1.11.2 Detección de mutaciones por cambio en un solo nucleótido (SNP) .	19
1.1.11.3 Microtitulación	20
1.1.11.4 Ensayo en placa de agar: prueba de crecimiento radial	20
1.1.11.5 Dilución en gradiente en espiral	21
2. LITERATURA CITADA.....	23
CAPÍTULO II	42
DISTRIBUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE AISLADOS DE <i>Neopestalotiopsis</i> spp. OBTENIDOS DE FRESA A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN	42
1. INTRODUCCIÓN.....	42
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.1 Ubicación del estudio y aislados	46
2.2 Preparación e incremento del inóculo de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	47
2.3 Fungicidas a evaluar en pruebas de sensibilidad	48
2.4 Preparación de solución stock de los fungicidas	48
2.5 Validación de método de dilución de gradiente en espiral	48
2.5.1 Prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> en medio enmendado con fungicidas ...	49
2.5.2 Prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> mediante microtitulación	49
2.5.3 Prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> de dilución en gradiente en espiral	50
2.6 Categorización de aislamientos por su nivel de resistencia.....	53
2.7 Detección de mutaciones en aislamientos con respuesta diferencial a fungicidas.....	54
2.7.1 Extracción de DNA por método CTAB 2%	54
2.7.2 Amplificación por PCR para genes multilocus.....	55
2.7.3 Electroforesis	56
2.7.4 Análisis filogenético	57
2.7.5 Análisis de mutaciones puntuales.....	64
2.8. Influencia del nivel de resistencia en la patogenicidad de aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	65
2.8.1 Material vegetal	65
2.8.2 Fungicidas	65
2.8.3 Desinfestación de material vegetal	65
2.8.4 Inoculación en hojas desprendidas de fresa	66
2.8.5 Variables evaluadas	66

2.8.6 Análisis estadístico	67
3. RESULTADOS	67
3.1 Validación del método gradiente en espiral por medio envenenado con fungicida y microtitulación	67
3.2 Sensibilidad de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. a los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol.....	68
3.3 Categorización de la respuesta a fungicidas.....	70
3.4 Identificación molecular y análisis filogenético de aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	71
3.4.1 Análisis de mutaciones puntuales.....	78
3.4.1.1 Mutación en gen <i>cyt b</i>	79
3.4.1.2 Mutación en gen <i>tub2</i>	79
3.5 Influencia del nivel de resistencia a fungicidas en la patogenicidad <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en hojas desprendidas	81
4. DISCUSIÓN	89
5. CONCLUSIONES.....	93
6. LITERATURA CITADA	94

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Fungicidas inhibidores multisitio y único sitio de acción (FRAC, 2022).	11
Cuadro 2. Origen de los aislados y variedades de donde se obtuvieron los aislados de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	47
Cuadro 3. Fungicidas evaluados para sensibilidad de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. (FRAC, 2022).	48
Cuadro 4. Aislamientos seleccionados de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. para la validación de métodos para determinar la sensibilidad a fungicidas.	49
Cuadro 5. Grado de sensibilidad a fungicidas con base en la CE_{50}	54
Cuadro 6. Iniciadores utilizados para la identificación filogenética de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	56
Cuadro 7. Secuencias de referencia utilizadas para el análisis filogenético con su número de acceso de GenBank.	58
Cuadro 8: Modelos de sustitución nucleotídica de región ITS y secuencias parciales de los genes, LSU, rpb2, tef-1 α y tub2.	60
Cuadro 9. Modelo de sustitución nucleotídica de la región ITS y los genes tef-1 α y tub2.....	61
Cuadro 10. Secuencias de referencia con número de acceso de GenBank, región ITS y genes (tef-1 α y tub2) para el análisis filogenético de <i>Neopestalotiopsis iranensis</i>	62
Cuadro 11. Iniciadores utilizados para la detección de mutaciones en los genes <i>cyt b</i> y <i>tub2</i> en aislamientos sometidos a los fungicidas azoxystrobin y metil-tiofanato.	64
Cuadro 12. Dosis comerciales de fungicidas recomendadas para el cultivo de fresa.	65
Cuadro 13: Comparación de medias de la EC_{50} de tres Fungicidas y tres métodos, para evaluar la sensibilidad de seis aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	67
Cuadro 14. Aislados de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. sensibles, medianamente resistentes y resistentes a los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol	71
Cuadro 15. Período de incubación, categorías de aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. con relación a la prueba de sensibilidad y patogenicidad y el origen del aislamiento.	87

Índice de Figuras

Figura 1. Zonas de colecta de material vegetal para el estudio en las zonas productoras de fresa de los estados de Michoacán, Guanajuato, Estado de México, Puebla y Jalisco (imagen generada por Google Maps).	46
Figura 2: Medición radial del crecimiento de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. expuesto a la concentración mínima inhibitoria (MIC), Concentración efectiva 50 (EC50) Y concentracion de inhibición total (TIC).	52
Figura 3. Valores de la CE_{50} del fungicida azoxystrobin para los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	69
Figura 4. Valores de la EC_{50} del fungicida boscalid para los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	69
Figura 5. Valores de la EC_{50} del fungicida difenoconazol para los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	70
Figura 6. Aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. seleccionados para la identificación molecular y pruebas de patogenicidad en hojas de fresa vs fungicidas.	72
Figura 7: Árbol filogenético bayesiano de la región ITS, con especies de los géneros <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Pseudopestalotiopsis</i> y <i>Neopestalotiopsis</i> . Los números en los nodos corresponden a los valores de probabilidades posteriores (PP). Las cepas en estudio están representadas en azul.	73
Figura 8: Árbol filogenético bayesiano construido con secuencias concatenadas de la región ITS: espaciadores transcritos internos, gen 5.8S; LSU: subunidad larga 28S de rDNA; <i>rpb2</i> : segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II dirigida por DNA; <i>tef-1α</i> : factor de elongación de traducción 1-alpha y <i>tub2</i> : gen parcial de β -tubulina. Las cepas en letras azules representan especies de <i>Neopestalotiopsis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> identificaron 12 aislados de <i>N. rosae</i> y un aislado de <i>Pestalotiopsis</i> sp. Se utilizó la secuencia de <i>Truncatella angustana</i> CBS 144025 como grupo externo. La barra de escala indica las sustituciones esperadas por sitio.	75
Figura 9. Árbol filogenético bayesiano construido con secuencias concatenadas con la región ITS: ITS: espaciadores transcritos internos, gen 5.8S; <i>tef-1α</i> : factor de elongación de traducción 1-alpha y <i>tub2</i> : gen parcial de β -tubulina. Los aislados en letras azules representan especies de <i>Neopestalotiopsis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> , se identificó dos aislados de <i>N. iranensis</i> . Se utilizó la secuencia de <i>Truncatella angustana</i> CBS 144025 como grupo externo. La barra de escala indica las sustituciones esperadas por sitio.	77
Figura 10. Índice de homoplasia de los aislados 5 y 70 con la especie <i>N. iranensis</i> indican no evidencia de recombinación ($P = 1.922E-6$).	78

Figura 11. Mutación G143A presente en aislados de <i>Neopestalotiopsis rosae</i> . Las mutaciones F129L, G137R y I151L no se detectaron en los aislados de <i>N. rosae</i> considerados en este estudio.....	80
Figura 12. Mutaciones E198K (ácido glutámico a lisina) y F200Y (Fenilalanina a tirosina) asociados al metil-tiofanato, presentes en aislamientos <i>N. rosae</i>	80
Figura 13. Comparación de la severidad causadas por los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis rosae</i> , <i>N. iranensis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> sp. en hojas de fresa tratadas con azoxystrobin.	81
Figura 14. Comparación de la severidad causada por los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis rosae</i> , <i>N. iranensis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> sp. en hojas de fresa tratadas con boscalid.....	82
Figura 15. Comparación de la severidad causada por los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis rosae</i> , <i>N. iranensis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> sp. en hojas de fresa tratadas con difenoconazol.	83
Figura 16. Comparación de la severidad causada por los aislamientos de <i>Neopestalotiopsis rosae</i> , <i>N. iranensis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> sp. en hojas de fresa tratadas con metil-tiofanato.....	84
Figura 17. Comparación de la severidad causada por aislamientos de <i>Neopestalotiopsis rosae</i> , <i>N. iranensis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> sp. en hojas de fresa.....	85
Figura 18: Severidad de aislados de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. y <i>Pestalotiopsis</i> sp. expuestos a azoxistrobin, boscalid, difenoconazol y metil-tiofanato.	86

DEDICATORIA

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia por el apoyo incondicional que me han brindado en cada etapa de mi vida. Especialmente, agradezco a mis padres por su dedicación y esfuerzo en mi formación académica, ya que, gracias a ellos, pude alcanzar mis metas profesionales. También quiero agradecer a mis queridas hermanas Laura y Mireya, quienes han sido un gran apoyo en las buenas y en las malas. Su amor y aliento me han ayudado a mantenerme firme en mi camino hacia el éxito. ¡Gracias, familia, por ser mi fuente de inspiración y motivación!"

Agradezco sinceramente el apoyo incondicional y la ayuda continua que Oscar González Torres me ha brindado en esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo (UACH)**, **Departamento de Parasitología Agrícola, Maestría en Protección Vegetal**, al brindarme la oportunidad de formar parte del programa y la contribución a mi formación profesional.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el financiamiento otorgado para cumplir mis estudios en el Posgrado.

Al **Centro Regional Centro Occidente Morelia (CRUCO)** de la Universidad Autónoma Chapingo, por el material e instalaciones otorgadas para llevar a cabo la investigación.

Al **Dr. Ángel Rebollar Alviter** por su orientación y guía, han sido fundamentales para mi desarrollo profesional, y estoy agradecida por su compromiso y dedicación en mi formación académica y a la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas** por su invaluable apoyo y enseñanzas en mi formación profesional. Además, les agradezco su disponibilidad y paciencia, que han sido fundamentales para mi desarrollo académico y personal.

Agradezco al **Dr. Gerardo Leyva Mir** por su invaluable apoyo y enseñanzas durante mi trayectoria académica, desde la licenciatura hasta formar parte de mi comité de investigación.

Agradezco a los compañeros que estuvieron en el período de mi estancia en el laboratorio de Fitopatología del Centro Regional Centro Occidente de la Universidad Autónoma Chapingo (**CRUCO**) y el laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Colegio de Posgraduados (**COLPOS**), por su invaluable ayuda durante mi estadía.

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre: Ana María Aguilera Blanco

Lugar de nacimiento: Vicente Guerrero, Durango.

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola.

Cedula Profesional: 10961258

CURP: AUBA941215MDGGLN04

FORMACION ACADÉMICA PROFESIONAL

Preparatoria Agrícola (2010-2013), Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Edo. de México.

Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola (2013-2017), Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Edo. de México.

En 2021 ingreso a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Edo. de México.

SENSIBILIDAD DE AISLADOS DE *Neopestalotiopsis* spp. OBTENIDOS DE FRESA A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN

RESUMEN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) es un cultivo de importancia económica en México. Uno de los patógenos emergentes que causa mancha foliar, tizón de la hoja y pudrición de raíz y corona el hongo *Neopestalotiopsis rosae* y otras especies de *Neopestalotiopsis* spp. El uso de fungicidas representa una herramienta importante para el manejo de la enfermedad, existe el riesgo de desarrollo de resistencia, por lo que es necesario conocer la sensibilidad de este patógeno a fungicidas de diferente modo de acción. En este estudio, se evaluó la distribución de la sensibilidad de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. por el método de gradiente en espiral a los fungicidas azoxystrobin, difenoconazol y boscalid. Posteriormente, se seleccionó una muestra de 15 aislamientos con diferentes niveles de sensibilidad a estos fungicidas y su identificación se realizó mediante reconstrucción filogenética con secuencias de la región ITS y secuencias parciales de los genes LSU, *tef-1 α* , *tub2* y *rpb2*. Además, se amplificaron regiones específicas relacionadas con la presencia de mutaciones puntuales en las regiones *cyt b* (fungicidas Qol) y *Tub2* (fungicidas benzimidazoles). Se evaluó la respuesta de severidad en hojas desprendidas de fresa, así como la efectividad de la aplicación preventiva de fungicidas contra estos aislamientos. Los resultados indicaron que la media de concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE₅₀) por azoxystrobin fue de 10.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 102 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para boscalid y 0.007 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para difenoconazol. En los aislados de *N. rosae* se expresó la mutación G143A asociada al azoxystrobin excepto para el aislado 201 y las mutaciones F200Y y E198K asociada al tiofanato metílico, se expresaron en los aislados de *N. rosae*. Los aislamientos 196, 201, 323, 418 y 466 de *N. rosae* fueron los más virulentos en presencia de los fungicidas azoxystrobin, boscalid y tiofanato metílico. Estos resultados proporcionan información para el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad y contribuyen a la selección de fungicidas adecuados para su control en la producción de fresa en México.

Palabras clave: *Neopestalotiopsis rosae*, *Neopestalotiopsis* spp., *Fragaria x ananassa*

SENSITIVITY OF ISOLATES OF *Neopestalotiopsis* spp. OBTAINED FROM STRAWBERRY TO FUNGICIDES OF DIFFERENT MODE OF ACTION

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) is a crop of economic importance in Mexico. One of the emerging pathogens that causes leaf spot, leaf blight, root rot and crown rot is the fungus *Neopestalotiopsis rosae* and other species of *Neopestalotiopsis* spp. The use of fungicides is an essential tool for disease management. However, there is a risk of resistance development, so it is necessary to know the sensitivity of this pathogen to fungicides with different modes of action. In this study, the distribution of the sensitivity of *Neopestalotiopsis* spp. by the spiral gradient method to the fungicides azoxystrobin, difenoconazole, and boscalid was determined. Subsequently, a sample of 15 isolates with different sensitivity levels to the previous fungicides was selected. Phylogenetic identification was conducted by amplifying the LSU, *tef-1α*, ITS, *tub2*, and *rpb2* regions by PCR. In addition, specific regions associated with the presence of point mutations in the Cyt b (QoI fungicides), and *tub2* (Benzimidazole fungicides) regions were amplified. The response (severity) of these isolates to preventive fungicide applications was evaluated in leaves detached from the results indicated that the mean effective concentration that inhibits mycelial growth by 50% (EC50) for azoxystrobin was 10.0 µg mL⁻¹, 102 µg mL⁻¹ for boscalid and 0.007 µg mL⁻¹ for difenoconazole, one of the *N. rosae* isolates expressed the G143A mutation associated with azoxystrobin except for isolate 201 and the F200Y and E198K mutations associated with thiophanate methyl were expressed in the *N. rosae* sample isolates. were the most virulent in the presence of the fungicides azoxystrobin, boscalid and methyl thiophanate. These results provide information for the development of disease management strategies and contribute to the selection of appropriate fungicides for the control in strawberry production in Mexico.

Key words: *Neopestalotiopsis rosae*, *Neopestalotiopsis* spp., *Fragaria × ananassa*

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fresa (*fragaria x ananassa*) es una fruta ampliamente distribuida en todo el mundo debido a sus cualidades organolépticas y la variedad de usos que tiene en la industria alimentaria (Mazzoni et al., 2016). La mejora genética de la fresa es un aspecto importante en su producción, ya que la fresa moderna es el resultado de hibridaciones entre *F. virginiana* y *F. chiloensis* (Darrow, 1966), estas mejoras han permitido obtener variedades con características superiores en cuanto a rendimiento, calidad de frutos y resistencia a enfermedades (Simpson, 2018).

A nivel mundial, la producción de fresa está liderada por China (6, 434,371 t), Estados Unidos de América (1, 021,490 t), México (861,337 t), Turquía (486,705 t) y Egipto (460,245 t), los cuales aportaron el 76.52% del total de la producción de fresa (FAOSTAT, 2021). En México el cultivo de fresa es importante desde el punto socioeconómico, debido a que genera empleo y divisas por ser producto de exportación para su consumo en fresco, congelado y procesado. Los principales estados productores son: Michoacán con 345,529.82 t, Baja California con 96,179 t, Guanajuato 96,199 t, Jalisco 9,523.2 t, Baja California Sur 7,942.77 t, Estado de México con 8,448.57 t, Aguascalientes 3,031.10 t, Tlaxcala 353.92 t, Oaxaca 261.9 t y Puebla con 236.61 t, con una producción total de 565,064.4 t (SIAP, 2023).

Los factores más importantes que influyen en la calidad de los frutos de fresa incluyen la selección de cultivares, la firmeza, el contenido de y la acidez de los frutos, así como la susceptibilidad a enfermedades. Además, los factores meteorológicos y el manejo y las condiciones de almacenamiento también pueden afectar la calidad de los frutos debido a su corta vida útil. La apariencia, firmeza, sabor, grado de madurez, brillo y ausencia de daños en los frutos son los principales aspectos considerados para determinar la calidad de la fresa. Sin embargo, las enfermedades fúngicas son una de las principales limitaciones en la producción de este cultivo, infligiendo pérdidas significativas para las zonas dedicadas a su cultivo

(Locascio & Saxena, 1967; Kadir et al., 2006; Rubio et al., 2019; Kadir & Carey, 2019).

Entre las enfermedades emergentes de la fresa se encuentran el tizón foliar, pudrición de raíz y corona de la fresa, causada por *Neopestalotiopsis* sp., este hongo fue primeramente reportado como el agente causal de la muerte de plantas de fresa en España (Chamorro et al., 2016) y Vietnam (Dũng et al., 2016), posteriormente en Uruguay (Machín et al., 2019) e Italia (Gilardi et al., 2019; Sigillo et al., 2020), y recientemente en Taiwán (Wu et al., 2021), México (Rebollar-Alviter et al., 2020) y Estados Unidos (Baggio et al., 2021).

La enfermedad se ha vuelto más prevalente y severa en los últimos años, causando hasta un 30% de pérdida después del trasplante en Taiwán (Wu et al., 2021). En México, la enfermedad ha causado pérdidas importantes en el cultivo de fresa desde el ciclo 2017-2018, y se ha asociado con síntomas de pudrición de corona y muerte de la planta. Las pérdidas de trasplante son más comunes en cultivos expuestos a la lluvia y largos períodos de humedad en las hojas (Rebollar-Alviter et al., 2020).

La resistencia a los fungicidas es una característica de la evolución del patógeno, que depende del ciclo de vida, las propiedades y la exposición a los fungicidas (Lucas et al., 2015). La resistencia a los fungicidas se consolidó por primera vez en 1970, cuando se introdujeron antimicóticos con modos de acción específicos (Brent, 2011). *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* y *Phytophthora infestans* son algunos de los patógenos que han presentado resistencia a fungicidas de diferentes modos de acción (Damicone, 2017).

La resistencia genética de un hongo a los fungicidas se asocia con la presencia de cambios que ocurren de forma natural o inducida, y es el resultado de la presión de selección ejercida por el fungicida (Damicone, 2017). Se han utilizado análisis de secuencias de los genes objetivo, que codifican los aminoácidos o las proteínas afectadas por el fungicida (Sierotzki & Scalliet, 2013).

El uso frecuente e indiscriminado de fungicidas puede acelerar la aparición de resistencia en los patógenos, lo que puede limitar la eficacia de estos productos en el futuro (Lucas et al., 2015). Por lo tanto, es necesario implementar un manejo integrado de enfermedades que incluya el uso racional y adecuado de fungicidas, la rotación de productos con diferentes modos de acción, el monitoreo constante de la sensibilidad de los patógenos a los fungicidas y la combinación de diferentes estrategias de control, como la utilización de variedades resistentes y el manejo de la humedad y la fertilización (Brent, 2011; Damicone, 2017).

Dentro de los grupos químicos que generan resistencia en los hongos se encuentran los benzimidazoles y las estrobilurinas (QoI), entre otros (Amil et al. 2007). La presencia de la mutación G143A en el gen *cyt b* en cepas de *Neopestalotiopsis* spp. que muestran resistencia al fungicida azoxystrobin ha sido recientemente reportada (Baggio et al., 2022). Por lo tanto, es esencial establecer una línea de base de sensibilidad en esta especie para detectar cambios posteriores en la sensibilidad o el desarrollo de resistencia en el hongo y desarrollar estrategias de manejo de resistencia a fungicidas de acción específica (Baggio et al., 2019; Baggio et al., 2022).

JUSTIFICACIÓN

Las recientes epidemias de mancha y tizón foliar, así como de pudrición de raíz y corona de la fresa a la que se asocia principalmente el hongo *N. rosae* y otras especies de *Neopestalotiopsis* han motivado el desarrollo de estudios de sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. de fresa a fungicidas de diferente modo de acción. Lo anterior debido a que los fungicidas, representan una de las alternativas de mayor importancia para reducir el impacto de esta enfermedad en México. Sin embargo, no se conoce el estado de la resistencia de cepas de *Neopestalotiopsis rosae* en fresa a fungicidas de mayor uso dada su reciente aparición como problema emergente. Conocer la sensibilidad del hongo a fungicidas de uso común tiene gran relevancia, pues se reducen las aplicaciones de manera innecesaria y se optimiza el manejo de las enfermedades resultando en mayor eficacia y un menor costo para el productor. Dada la relevancia y el impacto económico de la enfermedad en la producción de fresa, los objetivos de esta investigación fueron:

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la distribución de la sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. a fungicidas de diferente modo de acción y su relación con la patogenicidad en la fresa.

Objetivos específicos:

1. Determinar la distribución de la sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. obtenidos del cultivo de fresa a fungicidas de diferente modo de acción.
2. Detectar las mutaciones que explican la respuesta a fungicidas de diferente modo de acción en aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.
3. Determinar la influencia del nivel de resistencia en la patogenicidad de los aislamientos para causar manchas foliares en fresa.

HIPÓTESIS

1. La distribución de la sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. a fungicidas de diferente modo de acción es amplia e incluye aislados sensibles y resistentes.
2. La respuesta de *Neopestalotiopsis* spp. a fungicidas de diferente modo de acción, se explica en parte por la existencia de mutaciones en el sitio de acción de cada fungicida.
3. El nivel de resistencia de los aislamientos influye en su patogenicidad sobre hojas de fresa.

CAPÍTULO I

1.1 REVISIÓN DE LITERATURA

La fresa, perteneciente a la familia de las Rosáceas y al género *Fragaria*, es un cultivo ampliamente cultivado en todo el mundo. A lo largo de los años, se ha logrado transformar la planta de fresa en una especie altamente productiva, a través del mejoramiento de variedades, inducción de metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de hongos patógenos y capacidad de cosechar durante un largo período con frutos grandes para el envío a largas distancias (Simpson, 2018; Vanti et al., 2021). Sin embargo, la fresa es vulnerable a diversas patologías relacionadas con hongos tales como: el moho gris (*Botrytis cinerea*), *Alternaria* spp. (mancha de la hoja), pudrición y marchitez de la raíz (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*), necrosis de la raíz (*Rhizoctonia solani*), mancha púrpura en la hoja (*Mycosphaerella fragariae*), cenicilla (*Sphaerotheca macularis*) y pudrición del cuello (*Phytophthora cactorum* and *P. fragariae*) (Al-Rahbi et al., 2021; Ayoubi & Soleimani, 2016b; Parikka & Latvala, 2021). En México, las enfermedades causadas por *F. oxysporum*, *Neocosmospora solani*, *F. moniliforme*, *P. fragariae*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp., *Pythium aphanidermatum*, *Verticillium alboatrum*, *Colletotrichum* spp., *Cylindrocladim* spp. y *Ramularia* spp. causan pérdidas significativas en el cultivo de fresa (Undurraga & Vargas, 2013; Ceja-Torres et al., 2014; Bárcenas-Santana et al., 2019).

1.1.1 Mancha foliar, pudrición de raíz y corona por *Neopestalotiopsis* spp.

El tizón foliar, pudrición de la corona y/o raíz asociada al hongo *Neopestalotiopsis* spp. es una enfermedad emergente en el cultivo de fresa a nivel mundial (Ayoubi & Soleimani, 2016; Chamorro et al., 2016; Rebollar-Alviter et al., 2020; Maharachchikumbura et al., 2014b). Una reclasificación del género *Pestalotiopsis* basándose en tres genes, ITS (región del espacio transcrito interno de rDNA), *tef* (secuencias parciales del factor de elongación) y *tub2* (β -tubulina) han revelado dos

nuevos géneros, *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*, lo que ha llevado a la reasignación de algunas especies de *Pestalotiopsis* en cultivos convencionales (Maharachchikumbura et al., 2014; Baggio et al., 2020). *Neopestalotiopsis* se distingue de *Pestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis* por sus células medias versicoloreadas de los conidios y conidióforos indistintos (Li et al., 2021; Maharachchikumbura et al., 2014).

Pestalotiopsis longisetula, por ejemplo, se ha reportado como causante de pérdidas importantes en Brasil desde 2008 (Rodrigues et al., 2014), mientras que Chamorro et al. (2016) identificó a *Pestalotiopsis clavispora* (sin. *Neopestalotiopsis clavispora*) como la responsable de la mortalidad de plantas de fresa en España entre 2013 y 2014. En China, este hongo se ha asociado con el tizón en cáliz (Shi et al., 2022), mientras que en Finlandia se ha reportado una decoloración marrón rojiza en coronas causada por *N. clavispora*, que se presentaba junto con *P. cactorum* y *F. oxysporum* (Parikka & Latvala, 2021). Además, se ha informado que la pudrición de la raíz y corona de la fresa causada por *N. clavispora* en Italia, Corea, Argentina, Uruguay e India (Gilardi et al., 2019; Sigillo et al., 2020; Machín et al., 2019; Mahapatra et al., 2018; Obregón et al., 2018; Park et al., 2019).

En Irán, *Neopestalotiopsis iranensis* y *N. mesopotamica* se han asociado con la pudrición de la fresa (Ayoubi & Soleimani, 2016b), mientras que, en Ecuador, *N. mesopotamica* también se ha identificado como causante de pudrición en la corona (Intriago-Reyna et al., 2021; Hidrobo-Chávez et al., 2022). Asimismo, *Neopestalotiopsis rosae* ha sido reportada como causante del colapso de plantas de fresa en México (Rebollar-Alviter et al., 2020), Egipto (Essa et al., 2018), USA (Baggio et al., 2020), China (Sun et al., 2021) y Taiwán (Wu et al., 2021). Es muy probable que alguno de estos reportes en realidad se asocie con la presencia de *N. rosae*, en especial si en la identificación del hongo solo se consideró el uso de la región ITS (Baggio et al., 2021).

Es importante destacar que estos hongos representan una amenaza potencial para la producción de fresa en todo el mundo, y es necesario continuar investigando su taxonomía y su impacto en los cultivos de fresa para desarrollar medidas de control efectivas.

1.1.2 Taxonomía de *Neopestalotiopsis*

Maharachchikumbura et al. (2014b) reclasificaron a *Neopestalotiopsis* como una división de *Pestalotiopsis*, de acuerdo con la base de datos de Mycobank la clasificación taxonómica de *Neopestalotiopsis* es:

Dominio: Eukarya

Reino: Fungí

Subreino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina;

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Xylariomycetidae

Orden: Amphisphaeriales

Familia: Pestalotiopsidaceae

Género: *Neopestalotiopsis* (MYCOBANK, 2023)

1.1.3 Morfología de *Neopestalotiopsis* spp.

En cuanto a la morfología de especies de *Neopestalotiopsis*, en el caso de *N. rosae* los acérvulos producen conidios de cinco células, entre fusiformes y elipsoidales, los conidios con dos células centrales de color marrón y las células basales hialinas con pared fina de forma obcónica, los conidios miden de 22-37 μm de longitud y entre 7.5 a 9.5 μm de ancho. El ostíolo es prominente y está rodeado por un collar de células hialinas. El himenio es liso y de color oscuro, y contiene ascas que a su vez contienen ascosporas cilíndricas (14-23 μm de largo $\times$ 4-6 μm de ancho) y con una sola septa. Los apéndices basales no ramificados (5-8 μm de longitud) (Maharachchikumbura et al., 2014b).

Las colonias en PDA son de color blanco, presentan borde lobulado, el micelio se eleva moderado en la superficie, presentando conidiomas concéntricos negros, alcanzando de 30-40 mm de diámetro después de 7 d a 25 °C (Maharachchikumbura et al., 2014b; Rebollar-Alviter et al., 2020).

Otra especie con características morfológicas similares a *N. rosae* es *N. clavispora* identificada también por Maharachchikumbura et al., (2014b), como *Neopestalotiopsis* sp., el cual fue reportado y descrito por Chamorro et al. (2016), Gilardi et al. (2019), como micelio algodonoso de color blanco aéreo en PDA, conidos fusiformes o claviformes (23 × 6 µm aprox.), ligeramente curvados, con cuatro 4 septos, células basales hialinas cónicas de tres a cuatro apéndices hialinos (24 µm), las células centrales versicoloreadas siendo más oscuras a las basales. Estas especies a nivel morfológico no se pueden diferenciar, ya que comparten características, por lo que su identificación es mediante pruebas moleculares y análisis filogenético.

1.1.4 Rol ecológico y ambiental de *Neopestalotiopsis*

El género *Neopestalotiopsis*, de reciente aparición (Maharachchikumbura et al., 2014b; Jaklitsch et al., 2016; Hongsanan et al., 2017) ha recibido poca atención en cuanto a su capacidad para degradar celulosa. En la antigua clasificación de géneros, *Pestalotiopsis* se relacionó con la degradación de plásticos, pero Khruengsai, (2022), encontró que *Neopestalotiopsis phangnagaensis* tiene un potencial de biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE). Especies endófitas aislados de *Sporocadaceae* producen metabolitos (Maharachchikumbura et al., 2014b ; Liu et al., 2019b; Hyde et al., 2020), en especies de *Neopestalotiopsis* pueden actuar como endófitos o saprobios y se sabe que producen una amplia variedad de metabolitos secundarios (Maharachchikumbura et al., 2011). Las especies de *Neopestalotiopsis* tienen una fase saprofítica, lo que les permite sobrevivir en tejidos muertos y diseminarse a través del viento. También pueden

formar acérvulos, una estructura reproductiva asexual, cuyos conidios se liberan para infectar a otras plantas (Maharachchikumbura et al., 2013; Jayawardena et al., 2015).

Los taxones de *Sporocadaceae* son ecológicamente importantes, ya que aparecen como saprobios, endófitos o patógenos en hojas, ramas y frutos de una amplia gama de hospedantes (Hyde et al., 2017; Liu et al., 2019b). Varias especies, especialmente relacionadas con *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* y *Truncatella* se consideran patógenos de enfermedades destructivas en varios cultivos de importancia económica (Maharachchikumbura et al., 2016b).

Además, se han reportado numerosos informes de endófitos que producen compuestos novedosos con aplicaciones medicinales, agrícolas e industriales (Aly et al., 2010; Aly et al., 2013; Watanabe et al., 2010; Rönsberg et al., 2013; Xu et al., 2014) . Por lo tanto, se cree que las especies de *Neopestalotiopsis* son una fuente rica para la bioprospección en comparación con otros géneros de hongos. Se han aislado de hojas muertas, corteza y ramas (Maharachchikumbura et al., 2014a) y otras especies, como *Pestalotiopsis guepinii* y *P. microspora*, que se han encontrado en ambientes extremos (Tejesvi et al., 2007). Especies de *Pestalotiopsis* aisladas de manglares como endófito ha mostrado resistencia a cobre, cromo, plomo y zinc (Hamzah et al., 2020), reduciendo la cantidad de metales pesados en manglares. Sin embargo, es importante tener en cuenta que algunas especies de *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* también se han asociado con infecciones humanas y animales (Monden et al., 2013).

1.4.1.1 Especies de *Neopestalotiopsis* como endófitos

Se han realizado investigaciones adicionales sobre hongo endófito de especies de *Neopestalotiopsis* en diferentes plantas, que han revelado su potencial biotecnológico. Por ejemplo, en un estudio sobre la orquídea *Stanhopea tigrina*, se

encontró que *Neopestalotiopsis* sp. producía giberelinas, lo que podría tener aplicaciones en la producción de cultivos comerciales (Salazar-Cerezo et al., 2018). Otra especie *N. hadrolaeliae* también como endófito de raíces de orquídea (*Hadrolaelia jongheana*) (Freitas et al., 2019), Además, se ha descubierto que los aislados de *Neopestalotiopsis* de las plantas de canela (*Cinnamomum loureiroi*) pueden producir derivados de eugenol, un compuesto utilizado en industria alimentaria y cosmética (Tanapichatsakul et al., 2019).

1.1.5 Importancia del género *Neopestalotiopsis* como fitopatógeno

Las especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* también son conocidas por causar una variedad de enfermedades en las plantas, como pústulas, muerte regresiva de los brotes, manchas en hojas, tizón, tizón de la punta, tizón gris, cancro costroso, clorosis severa, y diversas enfermedades postcosecha (Crous et al., 2011; Maharachchikumbura et al., 2012; Maharachchikumbura et al., 2013 ; Zhang et al., 2013). El proceso de infección descrito por Rodrigues et al. (2014), describe a las cuantas horas se lleva a cabo la colonización, ya que, los conidios germinan a las 48 h, luego a las 72 h ya se observa la formación del tubo germinativo, posterior a las 96 h las hifas crecen intra e intercelularmente en el parénquima, mostrándose los acérvulos en la superficie de la hoja y finalmente a las 144 h los conidios son liberados de los acérvulos.

La infección por *Neopestalotiopsis* en las plantas de fresa puede resultar en síntomas graves, como la muerte de hojas, flores y brotes, y la aparición de decoloración o áreas marrones necróticas en la corona y la raíz (Chamorro et al., 2016; Wu et al., 2021). Los síntomas son más evidentes en plantaciones de fresa al aire libre y expuestas a la lluvia que en aquellas establecidas en túneles con temperaturas entre 23 y 27 °C (Rebollar-Alviter et al., 2020). Los propágulos del hongo se dispersan fácilmente por medio de operaciones de riego, cultivo, lluvia, salpicaduras y esparcimiento de conidios en el aire y cuando la temperatura ideal para el desarrollo de la enfermedad oscila entre 19 y 23 °C con presencia de agua

libre puede favorecer su propagación (Wu et al., 2021). Los síntomas descritos por Dǔng et al. (2016) incluyen el secado del borde de las hojas jóvenes, que progresa hacia la mitad del área de la hoja. Si las condiciones ambientales son favorables, estos síntomas se extienden a las hojas viejas y la planta se marchita y muere.

Bajo los factores abióticos, los síntomas descritos por Baggio et al. (2021, 2022); Rebollar-Alviter et al. (2020); Wu et al. (2021), en el cultivo de fresa causados por el agente causal *Neopestalotiopsis* sp. pueden variar en grado de daño, mencionan lesiones necróticas de color marrón con acérvulos negros en las hojas, en estolones y corona también lesiones necróticas color marrón, estas manchas pueden ser circulares u ovaladas, expandiéndose con el tiempo provocando secado o muerte del tejido, en el fruto presentan necrosis hundida de color marrón rojizo y en corona con necrosis marrón, con el tiempo avanza y puede provocar la muerte prematura de la planta.

Las fuentes de sobrevivencia de *Neopestalotiopsis* spp. va desde la planta madre, suelo, bandejas de propagación ya utilizadas, pasillos de camas a campo abierto o en invernadero, así como en restos de cultivo de fresa, sirviendo como reservorio del hongo y facilitando su diseminación en cultivos cercanos (Baggio & Peres, 2020).

1.1.6 Hospedantes de *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis*

Los géneros *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* tienen una diversidad de hospedantes, desde cultivos agrícolas, ornamentales, frutales y árboles forestales. Se han descubierto diversas especies de los géneros *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* que están asociados con árboles de eucalipto, entre ellas *N. australis*, *N. eucalypticola*, *N. mesopotamica*, *N. steyaertii*, *P. biciliata*, *P. colombiensis*, *P. disseminata*, *P. funereoidea*, *P. mangiferae*, *P. microspora*, *P. neglecta* y *P. virgatula* (Yuan & Mohammed, 1999; Suwannarach et al., 2012; Maharachchikumbura et al., 2016a; Maharachchikumbura et al., 2016b; Morales-Rodríguez et al., 2019). En *Pinus brutis* se reportó *N. mesopotámica* (Maharachchikumbura et al., 2014).

En plantas ornamentales se ha encontrado *Neopestalotiopsis rosae* en tallos de *Paeonia suffruticosa* y en lesiones de tallos de *Rosa* sp., donde su morfología es distinta a la de otros taxones del mismo género (Zhang et al., 2013). Asimismo, *N. protearum* como agente causal (pudrición parda) en *Camellia chrysantha* (Tang et al., 2021).

En árboles frutales, como el guayabo se han reportado especies de *Pestalotiopsis* (Darapanit et al., 2021; Solarte et al., 2018), *P. clavispora*, *P. microspora*, *Pestalotiopsis* sp. y *P. disseminata* causando daños en hojas y frutos y en postcosecha se ha reportado *N. brasiliensis* (Bezerra et al., 2018). Recientemente en Italia se ha reportado se ha reportado *N. rosae* causando agrietamiento de la corteza y tejido necrótico en aguacate (Fiorenza et al., 2022).

En berries, en el cultivo de arándano se han reportado más especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis*, además, se ha reportado a *Pestalotiopsis* sp. y *P. photiniae* en china (Chen et al., 2010; Luan et al., 2008), *N. rosae* en Perú causando muerte regresiva del arándano (Rodríguez-Gálvez et al., 2020). También se ha reportado a *N. chrysea* y *N. clavispora* en arándano en China y Corea del Sur (Lee et al., 2019; L. B. Shi et al., 2017).

Se han descrito varias especies de *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* que afectan la producción de fresa a nivel mundial. Entre ellas, la especie *Pestalotiopsis longisetula* se ha reportado como causante de pudrición de la fruta, además se han registrado casos de esta especie causando mancha foliar y pudrición de frutos en Egipto, según investigación realizadas por Embaby (2007). Esta misma especie ha causado daños severos en la corona de la planta de fresa en varios países, como Brasil (Rodrigues et al., 2014), Bélgica (Van Hemelrijck et al., 2017), Bangladesh (Düng et al., 2016; Ara et al., 2017) y México, donde ya se ha registrado daño foliar en las plantas de fresa, según un estudio de (Morales-Rodríguez et al., 2019).

En el caso de *Neopestalotiopsis*, se han reportado varias especies que afectan el cultivo de fresa, primeramente *N. clavispora* (Chamorro et al., 2016) se ha reportado causando pudrición de raíz y corona de fresa en España, Argentina (Obregón et al., 2018), Uruguay (MacHín et al., 2019), Italia (Gilardi et al., 2019), China (Shi et al., 2022), entre otros reportes. Además, *N. mesopotamica* y *N. iranensis* se han reportado en Irán (Ayoubi & Soleimani, 2016) y Ecuador (Hidrobo et al., 2021; Intriago-Reyna et al., 2021) causando manchas foliares necróticas, pudrición de la corona y lesiones en las frutas, también se ha reportado a *Neopestalotiopsis* sp. (Baggio et al., 2021; Rotondo et al., 2023). Por último, *N. rosae* agente causal de muerte de los tejidos de la corona y la pudrición de la fruta en China (Ma et al., 2023), Egipto (Essa et al., 2018), California (Lawrence et al., 2023), México (Rebollar-Alviter et al., 2020) y otros países de mundo.

1.1.7 Importancia económica

Neopestalotiopsis rosae y otras especies, han tenido un impacto importante, ya que han causado grandes pérdidas de producción en el cultivo de fresa, a partir de 2013, *N. clavispora* (Obregón et al., 2018) se documentó reducción de la producción en el cultivo de fresa para el 2017 en México se estimaron pérdidas de hasta el 50% (Rebollar-Alviter et al., 2020), además, en Taiwán se reportó una pérdida del 30% en el trasplante debido a esta especie en el periodo 2019-2020 (Wu et al., 2021), en Ecuador, la presencia de *N. mesopotamica* ha causado una disminución del 70% en las plantaciones de fresa en campo (Intriago-Reyna et al., 2021), mientras que en Ohio se ha reportado una incidencia del 80% en las plantaciones de fresa (Rotondo et al., 2023).

En resumen, la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* en las plantas de fresa es un problema significativo que puede causar graves pérdidas económicas y afectar la producción de fresa a nivel mundial, debido a la disminución de la calidad de la fruta, por consiguiente, afectando negativamente el rendimiento del cultivo.

La importancia económica de *Neopestalotiopsis* en el cultivo de fresa se debe a que puede afectar la calidad y cantidad de la producción, lo que resulta en pérdidas económicas para los productores. Además, el control de esta enfermedad puede ser costoso debido a que se requieren medidas preventivas y de manejo integrado para su control.

1.1.8 Manejo de las enfermedades causadas por *Neopestalotiopsis* spp. en fresa

El manejo integrado de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* spp. en cultivos de fresa incluye una combinación de medidas preventivas, culturales, biológicas y químicas. Entre las medidas preventivas, se recomienda la selección de variedades resistentes a la enfermedad, la eliminación de material vegetal infectado, el control de malezas y otros hospedantes alternativos, el uso de agentes de control biológico como *Trichodermas* spp. y *Bacillus* spp. (Widyaningsih & Triasih, 2021; Wu et al., 2018). Las medidas culturales incluyen prácticas de manejo adecuadas, como el riego por goteo y la eliminación de hojas y frutos infectados (Baggio et al., 2021; Rebollar-Alviter et al., 2020). Darapanit et al. (2021), menciona el uso de extractos vegetales contra *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*, para inhibir el crecimiento micelial, de los cuales la cúrcuma, jengibre, jamaica y clavo, son algunos de los extractos utilizados.

En el cultivo de fresa, existen varios fungicidas que han demostrado ser efectivos en el control de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* spp. En estudios *in vitro*, se ha encontrado que el captan, ciprodinil+ fludioxonil, difenoconazol, plocoraz y iprodiona son inhiben el crecimiento del hongo (Baggio et al., 2022; Darapanit et al., 2021; Rebollar-Alviter et al., 2020). Además, el thiram y el hymexazol también han mostrado eficacia en la inhibición del crecimiento del hongo (Essa et al., 2018). En ensayos realizados en campo y laboratorio, Baggio et al. (2022) encontraron que algunos grupos FRAC (3, 7, 9, 11, 12 y 29) donde difenoconazol, propiconazol, fludioxonil y fluazinam inhibieron un 50% de crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis* sp. y *N. rosae* en pruebas *in vitro* a concentraciones a partir de 1

$\mu\text{g mL}^{-1}$. Por otro lado, se ha descrito que los fungicidas iprodiona, propiconazol, cyprodinil+fludioxonil y difenoconazol tuvieron un control contra *Neopestalotiopsis*, excepto de azoxystrobin y trifloxystrobin mostrando un grado de resistencia (Chung et al. (2021).

En pruebas *in vitro*, se ha observado que el carbendazim, propiconazol y carbendazim+mancozeb detuvieron por completo el crecimiento de *N. clavispora* (Biju et al., 2018).

Es importante conocer el estatus de sensibilidad de este hongo a los fungicidas, ya que puede impactar en los costos de producción para los productores y en la selección de poblaciones de hongos resistentes a los fungicidas. Por lo tanto, es importante implementar programas de manejo de la resistencia a los fungicidas en un enfoque de manejo integrado de la enfermedad (Álvarez-Medina et al., 2017).

1.1.9 Modo de acción de fungicidas

Los fungicidas que actúan en un solo sitio de acción son considerados de alto riesgo para el desarrollo de resistencia en comparación con los que actúan en múltiples procesos celulares (McGrath, 2004; Patel et al., 2021). Los fungicidas modernos selectivos se unen a sitios específicos e interrumpen procesos celulares particulares, lo que los convierte en inhibidores de un solo sitio (específicos del sitio) en contraste con las clases de fungicidas anteriores que actúan en una variedad de procesos celulares y se consideran inhibidores multisitio (Cuadro 1). Existen mecanismo de acción de los fungicidas, utilizados para prevenir y controlar hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas, de los cuales se describen por la FRAC.

Cuadro 1. Fungicidas inhibidores multisitio y único sitio de acción (FRAC, 2022).

Modo de acción	Mecanismo de acción	Sitio de acción y nombre de grupo
B: Citoesqueleto y proteínas motoras	Inhibidor del ensamblaje de β -tubulina en mitosis	B1: metil-benzimidazoles carbamatos, Benzimidazol, B2: N-fenil carbamatos.
E: transducción de señales; D:	Inhibidor de la transducción de señales osmóticas	E3: dicaboximidas, DI: anilino-pirimidinas.

Modo de acción	Mecanismo de acción	Sitio de acción y nombre de grupo
aminoácidos y síntesis de proteínas G: biosíntesis de esteroides en membrana	Inhibidor de la biosíntesis de esteroides (SBI)	G1: Azoles, Triazoles, erg11, cyp51, G2: morfolinas, erg2-, G3: inhibidores de ketoreductasa, G4: Escualeno-epoxidasa en biosíntesis de esteroides.
A: metabolismo de ácidos nucleicos C: respiración	Inhibidor de la RNA polimerasa I Inhibidor de la respiración en el complejo II en SDH	A1: Fenilamidas y Acilalaninas. C2: Inhibidoras de succinato deshidrogenasa, carboxamidas.
D: Aminoácidos y síntesis de proteínas C: respiración	Inhibición de la biosíntesis de metionina Inhibidor de la respiración en el complejo III en el sitio Qo	D1: Anilino-Pirimidina C3: inhibidores externos de la quinona, estrobilurinas.
E: transducción de señales H: biosíntesis de la pared celular F: Síntesis de lípidos e integridad de la membrana	Inhibidores de la transducción de señales Inhibidores de la celulosa sintasa Homeostasis lipídica y transferencia/almacenamiento	E1: Azanaftalenos H5: Amidas de ácidos carboxílicos F9: inhibidores de la proteína de unión al oxisterol.

El modo de acción de las estrobilurinas es la interrupción de la cadena de transporte de electrones, lo que impide la respiración de los hongos y la síntesis de ATP al unirse al sitio Qo del Complejo III dentro de la mitocondria (FRAC, 2021; Patel et al., 2021). Los triazoles actúan como inhibidores de la desmetilación (DMI) y se dirigen al esteroide 14 α -desmetilasa (CYP51), una enzima reguladora importante en la vía biosintética del ergosterol, lo que lleva a la inhibición en la biosíntesis de (FRAC, 2021; Munkvold, 2009). Los benzimidazoles actúan mediante la inhibición de proteínas motoras y del citoesqueleto y su punto de acción está en el ensamblaje de las β -tubulinas en la mitosis (FRAC, 2021). En el caso de los SDHI, su modo de acción es la inhibición de la germinación de conidios, la elongación del tubo germinativo, el crecimiento micelial y la formación de conidios. Estos fungicidas inhiben la enzima succinato ubiquinona reductasa, que bloquea el Complejo II de la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial. Esta doble actividad fungicida interfiere en el transporte de electrones necesarios para la formación de ATP y la formación de los componentes de lípidos y aminoácidos del hongo. En conclusión,

conocer el modo de acción de los fungicidas es esencial para su uso efectivo y para prevenir el desarrollo de resistencia. Los fungicidas de un solo sitio de acción presentan un mayor riesgo de resistencia y se debe tener precaución en su uso.

1.1.10 Resistencia a fungicidas

"La resistencia a fungicidas por hongos es la capacidad adquirida por las cepas fúngicas para sobrevivir y crecer en presencia de fungicidas, lo que resulta en una ineficacia del fungicida y la persistencia de la infección fúngica" (FRAC, 2021; Köller et al., 2004; Damicone, 2017; Mikaberidze et al., 2017). Una vez que surge la resistencia, esta se hereda en la población del patógeno a través de un proceso evolutivo. La resistencia cualitativa se presenta por el uso continuo o excesivo del fungicida de modo de acción específico (Hobbelen et al., 2014), donde hay cambios genéticos que favorecen la proteína objetivo del fungicida, lo que impide que este se una y ejerza su acción inhibidora (Deising et al., 2008). Por otro lado, la resistencia cuantitativa a los fungicidas es más compleja y se refiere a una resistencia parcial o graduada. En lugar de ser una característica binaria, la resistencia cuantitativa se presenta como un espectro de resistencia que varía en intensidad. En este caso, múltiples genes y factores genéticos y ambientales contribuyen a la resistencia (Deising et al., 2008; Sierotzki et al., 2000).

Los hongos con resistencia cualitativa son inmunes al fungicida y sobreviven incluso en presencia de concentraciones altas del fungicida, no se observan fenotipos intermedios y la selección favorece a los individuos resistentes, lo que lleva a la desaparición de los individuos sensibles en la población. Y los hongos con resistencia cuantitativa tienen una tolerancia al fungicida, pero si pueden ser afectados por dosis altas del fungicida (Deising et al., 2008; Taylor & Cuniffe, 2022).

A finales de la década de 1970, el aumento del uso de los metil-benzimidazol-carbamato (MBC) y los inhibidores de la desmetilación (DMI) e inhibidores del

succinato deshidrogenasa (SDHI) han causado resistencia en algunos patógenos, y para la década de 1990 los inhibidores externos de la quinona (QoI) y los inhibidores del succinato deshidrogenasa (SDHI), de igual forma se ha presentado la aparición de resistencia por poblaciones de hongos (Fraaije et al., 2012).

En cuanto a los organismos que presentan resistencia, se ha obtenido evidencia donde levaduras y hongos de importancia clínica, como *Candida* spp. y *Aspergillus*, presentan resistencia a ciertos tratamientos antifúngicos (Espinell-Ingroff et al., 2017). Además, en hongos fitopatógenos como *Oculimacula acutiformis* y *O. yallundae*, la resistencia al plocoraz ha persistido varios años (Leroux et al., 2013b). *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* han mostrado resistencia a inhibidores de esterol 14 α -desmetilasa (DMI), inhibidores externos de la quinona (QoI), inhibidores del succinato deshidrogenasa (SDHI) y metil-benzimidazol-carbamato (MBC), entre otros (Sierotzki & Scalliet, 2013; Fernández-Ortuño et al., 2014; Lehner et al., 2015). Otro hongo que también presenta resistencia a los QoI es *M. graminicola* en el cultivo de trigo (Cools & Fraaije (2013a). En el caso de *Fusarium graminearum* con resistencia específica a tebuconazol, su crecimiento fue normal expuesto a diferentes temperaturas, y la producción de micotoxinas varió entre mutantes (Becher et al., 2010; como cita Hawkins & Fraaije, 2018). Aislamientos de *Venturia inaequalis* y *Phomopsis oscurans* de cultivo de fresa en China son resistentes a los fungicidas DMI (Shi et al., 2013), y *Alternaria alternata* de cultivo de tomate en Grecia son resistente a mancozeb (Malandrakis et al., 2015).

Omatsu et al. (2012) y Yamada & Sonoda (2012) describen la resistencia de *Pestalotiopsis longiseta* en planta de té, dichos aislados son resistentes a QoI, por lo que azoxystrobin aumentó el porcentaje de aislados resistentes a QoI. Yamada & Sonoda (2012) describen a los aislados de *P. longiseta* como resistente o sensible, altamente resistente a los que presentan un crecimiento después de 4 d de incubación, mientras un crecimiento evidente después de 7 d se consideró moderadamente resistente y posterior a los 7 d de crecimiento se considera sensible.

La resistencia a carbendazim por aislados de *Pestalotiopsis* sp. en cultivo de fresa de Tailandia, mostrando un crecimiento a 500 µg/mL de carbendazim, confirmando la sustitución de serina por lisina y valina por alanina en los codones 79 y 102 (Kummanid et al., 2017). Recientemente Baggio et al. (2022) en pruebas *in vitro* con aislados de *Neopestalotiopsis* sp. y *N. rosae* provenientes de fresa confirmaron la resistencia a azoxystrobin mediante el análisis del gen del citocromo b (cytb) y la detección de la mutación G143A.

Los autores también mencionan que la resistencia es resultado del uso excesivo de ingredientes activos en el control de otras enfermedades en el cultivo de fresa, lo que conduce a una mayor selección de resistencia a fungicidas.

1.1.10.1 Mutación puntual

Una mutación puntual se produce en un genoma cuando se añade, elimina o cambia un solo par de bases, puede tener diversas consecuencias funcionales, como cambios en la expresión de los genes o alteración en las proteínas codificadas (NIH, 2022).

1.1.10.1 Mutación puntual en fungicidas QoI

La resistencia a en fungicidas QoI generalmente es causada por un único aminoácido sustituido en el citocromo b dirigido codificado por el gen en cyt b en la mitocondria (Gisi et al., 2002; Baggio et al. 2019). Los cambios puntuales que se relacionan con la resistencia a los fungicidas inhibidores de la quinona exterior (QoI) son bien conocidos. Los QoI inhiben la compleja cadena de transporte de electrones mitocondrias de hongos. La mutación puntual G143A en la subunidad de proteína del complejo citocromo b (Cytb) ha sido descrita como la causa más común de resistencia a los QoI (Fisher et al., 2004; Baggio et al., 2022). También se han descubierto otras mutaciones puntuales como F129L fenilalanina por leucina, G137R glicina por arginina, G143S, G143T, I151L, I262V, V136A y Y131F que

contribuyen a la resistencia a los QoI en diferentes especies de hongos fitopatógenos (Fernández-Ortuño & Schnabel, 2012; Banno et al., 2019; Ishii et al., 2018; Zaffarano et al., 2016).

1.1.10.3 Mutaciones puntuales en fungicidas SDHI

La enzima succinato deshidrogenasa que codificada por el gen *sdh 3*, se compone de cuatro subunidades, tres de las cuales (SdhB, SdhC y SdhD) contribuyen al sitio activo. Estos fungicidas actúan en un determinado punto la respiración mitocondrial, inhibiendo la actividad del complejo respiratorio II de la cadena de transporte de electrones en la mitocondrial. El complejo II mitocondrial está formado por una flavoproteína (SdhA), una proteína hierro-azufre (SdhB) con tres grupos de hierro-azufre (S1, S2 y S3) y dos proteínas ancladas a la membrana (SdhC y SdhD). Las subunidades SdhA y SdhB forman la parte soluble del complejo II, que tiene actividad succinato deshidrogenasa, mientras que las subunidades SdhC y SdhD anclan las proteínas SdhA y SdhB en la membrana mitocondrial y ubiquinona, descritas previamente en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Yankovskaya et al., 2003; Oyedotun & Lemire, 2004).

En aislados de *B. cinerea* resistentes al boscalid, en la mayoría de los casos se relacionó a la mutaciones H272R y H272Y confiriendo niveles altos de resistencia a al boscalid (Fernández-Ortuño & Schnabel, 2012; Veloukas et al., (2013) menciona tres mutaciones en el codón 272 de la subunidad Sdh B, en el que se codifica un residuo de histidina en los aislados con sensibilidad, donde se ha demostrado previamente que estas mutaciones son las que predominan y confieren resistencia a los SDHI en los hongos fitopatógenos, incluyendo *B. cinerea*, donde las mutaciones estaban localizadas en el mismo codón. *Alternaria solani* y *A. alternata* se tienen registros de mutaciones en *sdhD*-D123E, *sdhB*-H277/8 Y/R, *sdhC*-H134R o *sdhD*-H133R (Landschoot et al., 2017), y en el caso de *B. cinerea* hay una variación de resultados en diferentes estudios, en la presencia de H272R/Y/L con sustitución de histidina por tirosina, leucina o arginina, y en el codón N230I una

asparagina por isoleucina y P225F, prolina por fenilalanina, histidina, leucina o treonina (Amiri et al., 2013b; Hu et al., 2016).

1.1.10.4 Mutaciones puntuales por fungicidas DMI

Los fungicidas inhibidores de estero 14 α -desmetilasa (DMI) son un grupo importante de fungicidas sistémicos que muestran un amplio espectro de actividad antifúngica. El uso continuo y exitoso de fungicidas DMI, incluso con la aparición de resistencia, justifica el desarrollo de nuevos fungicidas de esta clase (Chen et al., 2012). Se han reportado más de 30 mutaciones diferentes en el gen CYP51 que da origen a la sustitución o eliminación de aminoácidos (Cools et al., 2013b; Lehner et al., 2015). En el caso del Difenconazol, la regulación ascendente de los transportadores ABC o MFS, las alteraciones del gen CYP51, los niveles elevados de estero 14 α -desmetilasa causa la sobreexpresión del gen CYP51, son tres mecanismos responsables del fenotipo final de resistencia (Leroux & Walker, 2013a, como se cita en Yang et al. 2019). La alteración de CYP51 más reportada es Y137F en royas, levaduras y CYP51B en ascomicetos (Cools et al., 2013b) *Villosiclava virens* presenta la mutación Y136H (Wang et al. 2015), en casos de resistencia cruzada negativa se puede encontrar una compensación adicional en las mutaciones de CYP51 (Hawkins & Fraaije, 2018). En *Z. tritici*, I381V confiere una sensibilidad reducida al tebuconazol, pero aumenta la sensibilidad al plocoraz, y V136A confiere el efecto inverso (Cools et al., 2013b).

1.1.10.5 Mutaciones puntuales en fungicidas MBC

Los fungicidas Benzimidazoles son sistémicos de amplio espectro, y usados comercialmente para controlar enfermedades de plantas como benomilo, carbendazim, tiabendazole y metil-tiofanato (Leroux, 2007). Estos fungicidas inhiben el crecimiento micelial y provocan distorsiones de tubos germinativos, interfiriendo con la polimerización de la proteína β -tubulina impide la división celular. La resistencia resulta de por lo menos tres mutaciones puntuales, incluyendo las

presentes en la posición es 167, 198 y 200 del gen de la β -tubulina (Yarden and Katan, 1993, Leroux, 2007; Banno et al., 2008). Las sustituciones de aminoácidos en el gen β -tub reducen la unión y conducen a la resistencia a los fungicidas. Mutaciones puntuales que conducen a reemplazos de fenilalanina (F) por tirosina (Y), ácido glutámico (E) por alanina (A) o lisina (K) y fenilalanina (F) por tirosina (Y) en los codones 167 (F167Y), 198 (E198A/K) donde se da la sustitución de ácido glutámico por alanina y/o lisina y 200 (F200Y) en el gen β -tub, respectivamente, son las posiciones más comunes asociadas con la resistencia a los MBC (Z. Ma & Michailides, 2005). En especies de patógenos como *B. cinerea*, *Colletotrichum musae* se presenta la sustitución en F200Y y *M. fructicola* con E198A, *Pseudocercospora fijiensis* y *Didymella bryoniae* en F167Y o E198A (Chen et al., 2014; Vieira et al., 2017).

1.1.11 Métodos de monitoreo de resistencia a fungicidas

El mal uso o uso excesivo de un modo de acción de fungicidas puede acelerar significativamente los cambios en la población y llevar a la insensibilidad a los fungicidas. En el caso de los fungicidas multisitio, requieren múltiples cambios para desarrollar resistencia, mientras que, para los inhibidores de sitio único, un solo cambio de aminoácido en la proteína puede tener un alto nivel de resistencia, produciendo un cambio cualitativo que resulta en dos poblaciones distintas con una distribución de sensibilidad bimodal (Georgopoulos & Skylakakis, 1986).

Las técnicas de PCR y secuenciación permiten identificar mutaciones puntuales que conducen a los cambios en la secuencia de aminoácidos y que obtienen al hongo algún grado de resistencia a un fungicida. Estas técnicas son muy útiles para el monitoreo de la resistencia a fungicidas en patógenos de importancia económica. FRAC (comité de acción de resistencia a fungicidas) ha compilado una serie de técnicas de bioensayos que permiten determinar la sensibilidad de hongos a los fungicidas, estas deben ser sólidas, confiables y repetibles, siendo lo más simples posibles, en términos de tecnología y habilidades (Russell, 2008).

1.1.11.1 Dosis discriminatoria

La dosis discriminatoria de un fungicida se define como la concentración mínima que produce una respuesta claramente diferenciada entre la población sensible y la resistente (FRAC, 2017). Para la determinación de la dosis discriminatoria de los fungicidas se realizan bioensayos de sensibilidad *in vitro*, donde se evalúa la respuesta de una población de hongos a diferentes concentraciones del fungicida, se mide su respuesta a lo largo del tiempo, como el crecimiento relativo de la cepa o germinación de los conidios.

La determinación de la concentración efectiva 50 (EC₅₀) de los fungicidas, es un método utilizado para determinar la dosis para reducir el crecimiento del patógeno en un 50%, es importante en el diseño de estrategias de manejo integrado de enfermedades, permitiendo seleccionar el fungicida más efectivo para el control de la enfermedad (Romero & Sutton, 1997).

La insensibilidad a los fungicidas de acción específica puede ocurrir como resultado de un cambio en una proteína en el sitio de acción del fungicida mientras que para los fungicidas multisitio se supone que se requieren múltiples cambios (Lucas et al. 2015). El origen de la distribución de sensibilidad se puede dar unimodal o bimodal, unimodal significa que la mayoría de las poblaciones del patógeno tienen una sola sensibilidad al fungicida. Por otro lado, la distribución bimodal significa que hay dos grupos de poblaciones del patógeno, uno que es sensible al fungicida y otro que es resistente al fungicida (Georgopoulos & Skylakakis, 1986).

1.1.11.2 Detección de mutaciones por cambio en un solo nucleótido (SNP)

Para este método, se extrae el DNA del hongo y se realiza una PCR utilizando un kit específico para el hongo que se está evaluando, siguiendo un protocolo determinado. Después de la amplificación del ADN, se analiza el gel de electroforesis para determinar el número y tamaño de los fragmentos. Y para el monitoreo de la resistencia a los fungicidas en el caso de QoI, se buscan fragmentos

específicos en el gel de agarosa, en el caso del fragmento con 301 pb indican resistencia con la mutación G143A (Miessner et al. 2015).

1.1.11.3 Microtitulación

La microtitulación es otro método utilizado para el monitoreo de la resistencia a fungicidas en patógenos de importancia económica. Este método se basa en la determinación de la concentración efectiva 50 (CE₅₀) de un fungicida específico para un hongo dado a partir de someterlo a diferentes dosis del fungicida y posterior ajuste del modelo correspondiente. La microtitulación implica la preparación de una serie de diluciones del fungicida a evaluar en una placa de 96 pocillos. Luego, se agrega una suspensión de esporas del hongo a cada pocillo y se incuba durante un tiempo determinado. Después de la incubación, se mide la turbidez de cada pocillo con lecturas de absorbancia para determinar la CE₅₀, que es la concentración más baja del fungicida que inhibe el crecimiento del hongo al 50%. Para interpretar los resultados, se compara la CE₅₀ obtenida del aislado de hongo en cuestión con los valores de CE₅₀ de una población sensible conocida. Si la CE₅₀ del hongo es mayor que la CE₅₀ de la población sensible (línea base), se puede concluir que existe resistencia al fungicida evaluado (Spiegel & Stammler, 2006).

1.1.11.4 Ensayo en placa de agar: prueba de crecimiento radial

Las pruebas de sensibilidad de fungicidas se realizan en placas de agar para evaluar la capacidad de los hongos para crecer en presencia de diferentes concentraciones de fungicidas. Estas placas se preparan agregando diferentes concentraciones de fungicidas a medios de cultivo adecuados para el crecimiento de los hongos. Las concentraciones de fungicidas utilizados en las pruebas pueden variar según el fungicida y el hongo evaluados, y se determinan a partir de una serie de diluciones del fungicida en cuestión. Luego, se siembra un sacabocados del hongo en la superficie de la placa y se incuba durante un tiempo determinado. Después de la incubación, se evalúa el crecimiento del hongo en cada placa y se

determina el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, este se determina mediante la formula (Vincent, 1947, citado por Karthikeyan et al., 2021).

$$I = \left[\frac{C - T}{C} \right] * 100$$

I= porcentaje de inhibición,

C= crecimiento radial del control (mm), y

T= crecimiento radial del tratamiento (mm)

La determinación de la CE50 es en base al porcentaje de inhibición contra la dosis del fungicida que inhibe el 50% del crecimiento micelial el hongo.

1.1.11.5 Dilución en gradiente en espiral

El método gradiente en espiral fue introducido en 1990 para realizar estudios clínicos de bacterias (Paton et al. 1990 como cita Förster et al., 2004), y desde entonces ha sido utilizado como un método exacto y preciso para determinar las concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) de fungicidas en diferentes fitopatógenos (Förster et al., 2004). Este método consiste en recubrir el medio PDA con una solución stock de fungicida, formando una dilución en gradiente de la concentración radial, y evaluando la inhibición del crecimiento micelial o la germinación de conidios. Varios estudios han demostrado la eficacia del método gradiente en espiral en diferentes hongos, como *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Alternaria* sp. y otros (Baggio et al., 2018a; Gama et al., 2020; Rosenzweig et al., 2019; Oliveira et al., 2020). En general, el método gradiente en espiral se considera fiable y preciso para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* con diversos fitopatógenos.

La resistencia de un hongo a un fungicida puede determinarse mediante el método de gradiente en espiral, el cual se basa en la medición de puntos de crecimiento del micelio que varía según el fungicida específico y el tipo de hongo analizado (Espinel-Ingroff, 2001; Amiri et al., 2013; Förster et al., 2004). Para establecer la sensibilidad de un aislado y clasificarlo en categorías, se utilizan las CE₅₀, que corresponden a diferentes concentraciones del fungicida. Estas concentraciones permiten

determinar si el hongo es sensible (S), moderadamente resistente (MR) y resistente (R) al fungicida en cuestión (Qin et al., 2016; Rosenzweig et al., 2019; Zuniga et al., 2020).

2. LITERATURA CITADA

- Al-Rahbi, B. A. A., Al-Sadi, A. M., Al-Mahmooli, I. H., Al-Maawali, S. S., Al-Mahruqi, N. M. T., & Velazhahan, R. (2021). *Meyerozyma guilliermondii* SQUCC-33Y suppresses postharvest fruit rot of strawberry caused by *Alternaria alternata*. *Australasian Plant Pathology*, 50(3):349–352. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00779-z>.
- Álvarez-Medina, A., Silva-Rojas, H. V., Leyva-Mir, S. G., Marbán-Mendoza, N., & Rebollar-Alviter, A. (2017). Resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) to fungicides in Michoacan Mexico. *Agrociencia*, 51(7):783–798.
- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., & Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity*, 41:1–16. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0034-4>.
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2013). Fungal endophytes - secret producers of bioactive plant metabolites. *Pharmazie*, 68 (7):499–505. <https://doi.org/10.1691/ph.2013.6517>.
- Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. (2013). Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease*, 97(3):393-401. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0748-RE>
- Amrutha, P., & Vijayaraghavan, R. (2018). Evaluation of fungicides and biocontrol agents against *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf blight of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(8):622-628. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.067>
- Ara, T., Monzur, S., Saand, M. A., Islam, R., Alam, S., & Hossain, M. 2017. The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. *Int. J. Biosci.* 11:350–358.

- Ayoubi, N., & Soleimani, M. J. (2016). Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. *Current Microbiology*, 72(3):329–336. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0955-y>
- Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., & Peres, N. A. (2021). Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, 105:2–46. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1290-RE>
- Baggio, S. J., Forcelini B. B., Ruschel, R. G., Mertely, J. C. & Peres, N. (2019). Characterization, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Pestalotiopsis* spp. on strawberry in the U.S. Gulf Coast Research and Education Center, University of Florida, Wimauma, FL, USA. APS ANNUAL MEETING (Plant Health, 2019).
- Baggio, S. J., Marin, M. V., Mertely, C. J., & Peres, A. N. (2020). Chemical and cultivar trials to manage the new *Neopestalotiopsis* disease in Florida strawberry. UF/IFAS Gulf Coast Research and Education Center. Pp:8-10.
- Baggio, S. J., Rebello, C. S., de Moraes, M. B., Marin, M. V., Gama A. B., Forcelini B. B., Mertely, J. C., & Peres, N. A. 2022. Efficacy of single- and multi-site fungicides against *Neopestalotiopsis* spp. of strawberry. *Plant Disease*.
- Baggio, S. J., Wang, N. Y., Peres, N. A., & Amorim, L. (2018a). Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole, and thiophanate-methyl. *Tropical Plant Pathology*, 43(6):533–542. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0232-2>
- Bárcenas-Santana, D., Guillén-Sánchez, D., Basaldua, C., Ramos-García, M. L., & Valle-de la Paz, M. (2019). Etiology strawberry dry wilt (*Fragaria* spp.) in Morelos, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3):454-463. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-5>
- Banno, S., Fukumori, F., Ichiishi, A., Okada, K., Uekusa, H., Kimura, M., & Fujimura, M. (2008). Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 98(4):397–404. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0397>

- Banno, S., Nakamura, I., Ito, M., & Togawa, M. (2019). Qol-resistance mechanisms in Japanese population of *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Pesticide Science*, 44(3):149–154. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-1-0048>
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H. B., & Wirsal, S. G. R. (2010). Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology*, 100(5):444–453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-5-0444>
- Bezerra, J. D. P., Machado, A. R., Firmino, A. L., Rosado, A. W. C., de Souza, C. A. F., de Souza-Motta, C. M., de Sousa Freire, K. T. L., Paiva, L. M., Magalhães, O. M. C., Pereira, O. L., Crous, P. W., de Oliveira, T. G. L., de Abreu, V. P., & Fan, X. (2018). Mycological diversity description I. *Acta Botanica Brasilica*, 32(4):656–666. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0154>
- Biju, C. N., Peeran, M. F., & Gowri, R. (2018). Identification and characterization of *Neopestalotiopsis clavispora* associated with leaf blight of small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Journal of Phytopathology*. 166:532–546. <https://doi.org/10.1111/jph.12715>
- Brent, K. (2011). Historical perspectives of fungicide resistance. In *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. <https://doi.org/10.1079/9781845939052.0003>
- 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*, 100(7):1495-1495. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>
- Chen, C. Q., Zhang, B., & Gao, J. (2010). Leaf spot disease of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) caused by *Pestalotiopsis photinae* newly reported in China. *New Disease Reports*, 22(1):31–31. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.022.031>
- Chen, F. P., Fan, J. R., Zhou, T., Liu, X. L., Liu, J. L., & Schnabel, G. (2012). Baseline sensitivity of *Monilinia Fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. *Plant Disease*, 96(3):416-422. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0495>

- Chen, S. N., Shang, Y., Wang, Y., Schnabel, G., Yin, L. F., & Luo, C. X. (2014). Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in China to four fungicides and characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. *Plant Disease*, 98(11):1–29. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1145-RE>
- Chung, P.-C., Chung, C.-L. y Chung, H.-M. (2021). 草莓新興病害 - 葉枯病病原鑑定及防治方法 [Emerging disease of strawberry - Identification of the pathogen causing leaf blight and its control methods]. 台灣農業研究, (MDARES Bulletin) 10:1–14.
- Cools, H. J., & Fraaije, B. A. (2013a). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. In *Pest Management Science*, 69(2):150-155. <https://doi.org/10.1002/ps.3348>
- Cools, H. J., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2013b). Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology*, 62(1):36–42. <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>
- Crous, P. W., Summerell, B. A., Swart, L., Denman, S., Taylor, J. E., Bezuidenhout, C. M., Palm, M. E., Marincowitz, S., & Groenewald, J. Z. (2011). Fungal pathogens of Proteaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27:20–45. <https://doi.org/10.3767/003158511X606239>
- Damicone, J. (2017). Fungicide Resistance Management. *Oklahoma Cooperative Extension Service*.
- Darapanit, A., Boonyuen, N., Leesutthiphonchai, W., Nuankaew, S., & Piasai, O. (2021). Identification, pathogenicity, and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases. *Scientific Reports*, 11(1):22606. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02113-5>
- Da Silva P. A., Bacchi, L. M. A., & Gavassoni, W. L. (2016). Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. *Revista Ciência Agronômica*, 47:203–212.
- Deising, H. B., Reimann, S., & Pascholati, S. F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2): 286–295. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>

- Dũng, L., Diên, N. T., Đại, P. H., & Tuân, P. N. (2016). The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberries in dalat. *Tạp Chí Khoa Học Đại Học Đà Lạt*, 6(3). [https://doi.org/10.37569/dalatuniversity.6.3.81\(2016\)](https://doi.org/10.37569/dalatuniversity.6.3.81(2016)).
- EFSA (2011). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance azoxystrobin. European Food Safety Authority, 9(7): 2302. Disponible en línea en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2302>
- Espinel-Ingroff, A., Arendrup, M., Canton, E., Cordob, S., Dannaoui, E., Garcia-Rodriguez, J., Gonzalez, G. M., Govender, N. P., Martin-Mazuelos, E., Lackner, M., Lass-Flörl, C., Linares Sicilia, M. J., Rodriguez-Iglesias, M. A., Pelaez, T., Shields, R. K., Garcia-Effron, G., Guinea, J., Sanguinetti, M., & Turnidge, J. (2017). Multicenter study of method-dependent epidemiological cutoff values for detection of resistance in *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. to amphotericin B and echinocandins for the etest agar diffusion method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01792-16>
- Essa, T., Kamel, S., Ismail, A., & El-Ganainy, S. (2018). Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 46(1):1–19. <https://doi.org/10.21608/ejp.2018.87411>
- FAOSTAT (2021). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Consultado el 10 de noviembre del 2021 en <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>.
- Fernández-Ortuño, D., Pérez-García, A., Chamorro, M., de Vicente, A. & Torés, J. A. (2011). Sensitivity of *Alternaria alternata* to difenoconazole varies during the season and with temperature. *Plant Disease*, 95(5):577-584.
- Fernández-Ortuño, D., & Schnabel, G. (2012). First report of thiophanate-methyl resistance in *Botrytis cinerea* on strawberry from South Carolina. In *Plant Disease*, 96(11):1700-1700. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0557-PDN>
- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., & Schnabel, G. (2014). Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven Southern U.S. States. *Plant Disease*, 98(6):825-833. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0970-RE>

- Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Li, X., Schnabel, G., & Pérez-García, A. (2017). Resistance mechanisms to medical and agricultural azole drugs. In *The Mechanisms of Fungal Infection* (pp. 295-327). Springer.
- Fisher, N., Brown, A. C., Sexton, G., Cook, A., Windass, J., & Meunier, B. (2004). Modeling the Q(o) site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. *European Journal of Biochemistry*. 271:2264–2271.
- Förster, H., Kanetis, L., & Adaskaveg, J. E. (2004). Spiral gradient dilution, a rapid method for determining growth responses and 50% effective concentration values in fungus-fungicide interactions. *Phytopathology*, 94 (2):163–170. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.163>
- Fraaije, B. A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H. J., Lucas, J. A., & Fraaije, M. W. (2012). Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 13(3):263–275. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>
- FRAC. (2022). FRAC code list©2022: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). https://www.frac.info/docs/default-source/publications/2022/frac-code-list-2022-final.pdf?sfvrsn=9e02fa3a_2.
- Freitas, E. F. S., Silva, M. D. A., Barros, M. V. P., & Kasuya, M. C. M. (2019). *Neopestalotiopsis hadrolaeliae* sp. Nov., A new endophytic species from the roots of the endangered orchid *Hadrolaelia jongheana* in Brazil. *Phytotaxa*, 416(3):211-220. <https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.416.3.2>
- Gama, A. B., Baggio, J. S., Rebello, C. S., de Afonseca Lourenço, S., Gasparoto, M. C. de G., da Silva, G. J., Peres, N. A., & Amorim, L. (2020). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* Isolates from Citrus to carbendazim, difenoconazole, tebuconazole, and trifloxystrobin. *Plant Disease*, 104(6):1–42. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2195-RE>
- Georgopoulos, S. G., & Skylakakis, G. (1986). Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection*, 5(5):299–305. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(86\)90107-9](https://doi.org/10.1016/0261-2194(86)90107-9)

- Gilardi, G., Bergeretti, F., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. 2019. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry in Italy. *Plant Disease*, 103:2959–2959. doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0673-PDN.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., & McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, 58(9):859–867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>
- Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2018). Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. In *Annual Review of Phytopathology*, 56:339-360. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050012>
- Hamzah, T. N. T., Ozturk, M., Altay, V., & Hakeem, K. R. (2020). Insights into the bioactive compounds of endophytic fungi in mangroves. In *Biodiversity and Biomedicine: Our Future*. Chapter 15:277–292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819541-3.00015-3>
- Hidrobo-Chavez, J., Ramírez-Villacís, D. X., Barriga-Medina, N., Herrera, K., & León-Reyes, A. (2022). First report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on strawberry in Ecuador. *Plant Disease*, 106(3):1066. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1278-PDN>
- Hobbelen, P. H. F., Paveley, N. D., & van den Bosch, F. (2014). The emergence of resistance to fungicides. *PLoS ONE*, 9(3):e91910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091910>
- Hollomon, D. W., & Brent, K. J. (2009). Combating plant diseases - The Darwin connection. *Pest Management Science*, 65(11):1156–1163. <https://doi.org/10.1002/ps.1845>
- Hu, M. J., Fernández-Ortuño, D., & Schnabel, G. (2016). Monitoring resistance to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea* from strawberry fields. *Plant Disease*, 100(5):959–965. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-15-1210-RE>
- Hyde, K. D., Norphanphoun, C., Abreu, V. P., Bazzicalupo, A., Thilini Chethana, K. W., Clericuzio, M., Dayarathne, M. C., Dissanayake, A. J., Ekanayaka, A. H., He, M. Q., Hongsan, S., Huang, S. K., Jayasiri, S. C., Jayawardena, R. S., Karunarathna, A., Konta, S., Kušan, I., Lee, H., Li, J., ... & Mortimer, P. E. (2017). Fungal diversity notes 603–708: taxonomic and phylogenetic notes

- on genera and species. *Fungal Diversity*, 87:1–235.
<https://doi.org/10.1007/s13225-017-0391-3>
- Hyde, K. D., Norphanphoun, C., Maharachchikumbura, S. S. N., Bhat, D. J., Jones, E. B. G., Bundhun, D., Chen, Y. J., Bao, D. F., Boonmee, S., Calabon, M. S., Chaiwan, N., Chethana, K. W. T., Dai, D. Q., Dayarathne, M. C., Devadatha, B., Dissanayake, A. J., Dissanayake, L. S., Doilom, M., Dong, W., ... Xiang, M. M. (2020). Refined families of Sordariomycetes. *Mycosphere*, 11(1):305–1059. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/7>
- Intriago-Reyna, H. O., Rivas-Figueroa, F. J., Rivera-Casignia, Á. M., Álvarez-Romero, P. I., & Ferreira, A. F. T. A. F. e. (2021). Outbreaks of crown rot in *Fragaria × ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 33(6):520–527. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i6.2718>
- Ishii, H., Hollomon, D. W., & Motoyama, N. (2018). Resistance to QoI fungicides in plant pathogenic fungi. *Pest Management Science*, 74(11):2246–2253.
- Jayawardena, R. S., Zhang, W., Liu, M., Maharachchikumbura, S. S. N., Zhou, Y., Huang, J. B., Nilthong, S., Wang, Z. Y., Li, X. H., Yan, J. Y., & Hyde, K. D. (2015). Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. *Fungal Biology*, 119(5):348–361. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.001>
- Kadir, S., Carey, E., & Ennahli, S. (2006). Influence of high tunnel and field conditions on strawberry growth and development. *HortScience*, 41(2):329–335. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.2.329>
- Kadir, S., & Carey, E. (2019). Off-season strawberry production under high tunnel compared to open field in Kansas. *HortScience*, 39(4):770–770. <https://doi.org/10.21273/hortsci.39.4.770b>
- Karthikeyan, R., Kumar, S., Prasad, R., & Singh, M. (2021). *In vitro* evaluation of fungicides and botanicals against *Alternaria brassicae* causing leaf blight of mustard. *International Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 1(1):169

- Khruengsai, S., Sripahco, T. and Pripdeevech, P. (2022). Microbial degradation of low-density polyethylene by *Neopestalotiopsis phangngaensis*. *Journal of general and applied microbiology*, 68(6):287-294. <https://doi.org/10.2323/jgam.2022.07.001>.
- Köller, W., Parker, D. M., Turechek, W. W., Avila-Adame, C., & Cronshaw, K. (2004). A two-phase resistance response of *Venturia inaequalis* populations to the QoI fungicides kresoxim-methyl and trifloxystrobin. *Plant Disease*, 88(5):537–544. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.537>
- Kummanid, J., Akimitsu, K., & Nalumpang, S. (2017). Mutations of the β -tubulin gene fragments from carbendazim-resistant isolates of *Pestalotiopsis* sp. causing strawberry leaf blight in Chiang Mai, Thailand. *Journal of Phytopathology*, 165(7–8):515–521. <https://doi.org/10.1111/jph.12588>
- Landschoot, S., Carrette, J., Vandecasteele, M., de Baets, B., Höfte, M., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2017). Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe. *Crop Protection*, 92:49–59. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.011>
- Lehner, M. S., Paula Júnior, T. J., Silva, R. A., Vieira, R. F., Carneiro, J. E. S., Schnabel, G., & Mizubuti, E. S. G. (2015). Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum*: A thorough assessment using discriminatory dose, EC50, high-resolution melting analysis, and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. *Plant Disease*, 99(11):1537–1543. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1231-RE>
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, RW, Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013). Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a new clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 79:159-216
- Leroux, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. pp. 195–222. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_12
- Leroux, P., & Walker, A. S. (2013a). Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4):683–693. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0105-3>

- Leroux, P., Gredt, M., Remuson, F., Micoud, A., & Walker, A. S. (2013b). Fungicide resistance status in French populations of the wheat eyespot fungi *Oculimacula acuformis* and *Oculimacula yallundae*. In *Pest Management Science*, 69(1):15–26. <https://doi.org/10.1002/ps.3408>
- Li, L., Yang, Q., & Li, H. (2021). Morphology, phylogeny, and pathogenicity of pestalotioid species on *Camellia oleifera* in China. *Journal of Fungi*, 7(12):1080. <https://doi.org/10.3390/jof7121080>
- Liu, Y. H., Yuan, S. K., Hu, X. R., & Zhang, C. Q. (2019). Shift of sensitivity in *Botrytis cinerea* to benzimidazole fungicides in strawberry greenhouse ascribing to the rising-lowering of E198A subpopulation and its visual, on-site monitoring by Loop-mediated Isothermal Amplification. *Scientific Reports*, 9(1):11644. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48264-4>
- Locascio, S., & Saxena, G. (1967). Effects of potassium source and rate and nitrogen rate on strawberry tissue composition and fruit yield. *Journal of Plant Sciences*, 10 (4):142-149.
- Luan, Y. S., Shang, Z. T., Su, Q., Feng, L., & An, L. J. (2008). First report of a *Pestalotiopsis* sp. causing leaf spot of blueberry in China. *Plant Disease*, 92(1):171-171. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-1-0171a>
- Lucas, A. J., Hawkins, J. N., & Fraaije, A. B. (2015). Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90:29-92.
- Lee, Y., Kim, G. H., Kim, Y., Park, S. Y., & Koh, Y. J. (2019). First report of twig dieback caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on Blueberry in Korea. *Plant Disease*, 103(5):1022. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1734-PDN>
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24(10):853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>
- Machín, A., González, P., Vicente, E., Sánchez, M., Estelda, C., Ghelfi, J., & Silvera-Pérez, E. (2019). First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on Strawberry in Uruguay. *Plant Disease*, 103 (11):2946–2946. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN>

- Mahapatra, S., Banerjee, J., Kumar, K., Pramanik, S., Pramanik, K., Islam, S., & Das, S. (2018). Leaf spot and fruit rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Indo-Gangetic plains of India. *Indian Phytopathology*, 71(2):279–283. <https://doi.org/10.1007/s42360-018-0043-x>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50:167–187. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W. P., Sun, X., Crous, P. W., Bhat, D. J., McKenzie, E. H. C., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2012). A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, 56(1):95–129. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0198-1>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Chukeatirote, E., Guo, L. D., Crous, P. W., McKenzie, E. H. C., & Hyde, K. D. (2013). *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea). *Mycotaxon*, 123(15):47–61. <https://doi.org/10.5248/123.47>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2014a). Improving the backbone tree for the genus *Pestalotiopsis*; addition of *P. steyaertii* and *P. magna* sp. nov. *Mycological Progress*, 13(3):617–624. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0944-0>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014b). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1):121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Larignon, P., Hyde, K. D., Al-Sadi, A. M., & Liu, Z. Y. (2016^a). Characterization of *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis*, and *Truncatella* species associated with grapevine trunk diseases in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(3):380–390. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-18298
- Maharachchikumbura, S. S. N., Wu, S. P., Hyde, K. D., Al-Sadi, A. M., & Liu, Z. Y. (2016b). First report of sweet potato leaf spot caused by *Neopestalotiopsis ellipsospora* in Guizhou Province, China. *Journal of Plant Pathology*, 98(3). 10.4454/JPP.V98I3.073

- Malandrakis, A. A., Apostolidou, Z. A., Markoglou, A., & Flouri, F. (2015). Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3):489–499. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>
- Mazzoni, L., Pérez, A. G., Civello, P. M., & Chaves, A. R. (2016). Fesa (*Fragaria × ananassa*, Duch): composición, valor nutricional e impacto en la salud humana. *Nutricion*, 32(6):670–677.
- McGrath, M. T. (2004). What are Fungicides? *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2004-0825-01>
- Miessner, S., Koch, A. & Stammler, G. (2015). Molecular genetic detection of G143A mutation conferring QoI resistance in *Venturia inaequalis* in apple leaves. Monitoring methods FRAC. BASF SE, Limburgerthof, Germany.
- Mikaberidze, A., Paveley, N., Bonhoeffer, S., & van den Bosch, F. (2017). Emergence of resistance to fungicides: The role of fungicide dose. *Phytopathology*, 107(5):545–560. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-16-0297-R>
- Milvia, D. R., Rotolo, C., Masiello, M., Gerin, D., Pollastro, S., & Faretra, F. (2014). Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. *Pest Manag*, 70:1785–1796.
- Monden, Y., Yamamoto, S., Yamakawa, R., Sunada, A., Asari, S., Makimura, K., & Inoue, Y. (2013). First case of fungal keratitis caused by *Pestalotiopsis clavispora*. *Clinical Ophthalmology*, 7:2261–2264. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S48732>
- Morales-Mora, L. A., Martínez-Salgado, S. J., De Ita, M. A. V., Andrade-Hoyos, P., Silva-Rojas, H. V., & Romero-Arenas, O. (2019). First report of leaf spot and anthracnosis caused by *Pestalotiopsis* sp. on strawberry in Puebla, Mexico. *Plant Disease*, 103(10):2668–2668. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1010-PDN>
- Morales-Rodríguez, C., Dalla Valle, M., Aleandri, M. P., & Vannini, A. (2019). *Pestalotiopsis biciliata*, a new leaf pathogen of *Eucalyptus* spp. recorded in Italy. *Forest Pathology*, 49(2):e12492. <https://doi.org/10.1111/efp.12492>

- Munkvold, G. P. (2009). Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology*, 47:285–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081916>
- MYCOBANK. (2023). Maharachch., K.D. Hyde & Crous, *Studies in Mycology*, 79:135. <https://www.mycobank.org/Simple%20names%20search>
- Obregón, V. G., Meneguzzi, N. G., Ibañez, J. M., Lattar, T. E., & Kirschbaum, D. S. (2018). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. In *Plant Disease*, 102(9):1856–1856. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN>
- Oliveira, M. S., Cordova, L. G., & Peres, N. A. (2020). Efficacy and baseline sensitivity of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicides for management of *Colletotrichum* crown rot of strawberry. *Plant Disease*, 104(11):2860–2865. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0083-RE>
- Omatsu, N., Tomihama, T., & Nonaka, Y. (2012). Incidence of strobilurin- and benzimidazole-resistant strains of *Pestalotiopsis longiseta*, causal agent of gray blight, and practical control in tea field of Kagoshima Prefecture. *Japanese Journal of Phytopathology*, 78(1):3–9. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.78.3>
- Oyedotun, K. S., & Lemire, B. D. (2004). The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase: Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10):9424–9431. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311876200>
- Parikka, P., & Latvala, S. (2021). Soil-borne diseases increasing in Finnish strawberry production. *Acta Horticulturae*, 1309. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1309.104>
- Park, K., Han, I., Lee, S. M., Choi, S. L., Kim, M. C., & Lee, H. (2019). Crown and root rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. *Korean Journal of Mycology*, 47(4):427–435. <https://doi.org/10.4489/KJM.20190047>
- Patel, J. S., Wyenandt, C. A., & McGrath, M. T. (2021). Effective downy mildew management in basil using resistant varieties, environment modifications, and

- fungicides. *Plant Health Progress*, 22(3):226–234. <https://doi.org/10.1094/PHP-02-21-0041-FI>
- Paton, J. H., Holt, H. A., & Bywater, M. J. (1990). Measurement of MICs of antibacterial agents by spiral gradient endpoint compared with conventional dilution method. *International Journal of Experimental and Clinical Chemotherapy*, 34(1):170–174.
- Pong, R., Boost, M. V., O'Donoghue, M. M., & Appelbaum, P. C. (2010). Spiral gradient endpoint susceptibility testing: A fresh look at a neglected technique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9):1959–1963. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq239>
- Qin, C. F., He, M. H., Chen, F. P., Zhu, W., Yang, L. N., Wu, E. J., Guo, Z. L., Shang, L. P., & Zhan, J. (2016). Comparative analyses of fungicide sensitivity and SSR marker variations indicate a low risk of developing azoxystrobin resistance in *Phytophthora infestans*. *Scientific Reports*, 6:20483. <https://doi.org/10.1038/SREP20483>
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., & Parra-Robles, B. E. (2020). An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in México. *Plant Disease*, 104(8):2054–2059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>
- Rodrigues, F. A., Silva, I. T., Antunes Cruz, M. F., & Carré-Missio, V. (2014). The infection process of *Pestalotiopsis longisetula* leaf spot on strawberry leaves. *Journal of Phytopathology*, 162(10):690–692. <https://doi.org/10.1111/jph.12226>
- Rodríguez-Gálvez, E., Hilário, S., Lopes, A., & Alves, A. (2020). Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 157(1): 89–102. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01983-1>
- Romero, R. A., & Sutton, T. B. (1997). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology*, 87(1):96–100. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.1.96>

- Rönsberg, D., Debbab, A., Mándi, A., Wray, V., Dai, H., Kurtán, T., Proksch, P., & Aly, A. H. (2013). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Letters*, 54(25):3256–3259. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.04.031>
- Rosenzweig, N., Hanson, L. E., Mambetova, S., Jiang, Q. W., Guza, C., Stewart, J., & Somohano, P. (2019). Fungicide sensitivity monitoring of *Alternaria* spp. Causing leaf spot of sugarbeet (*Beta vulgaris*) in the Upper Great Lakes. In *Plant Disease*, 103(9):2263–2270. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2282-RE>
- Rubio, L., Sanllorente, S., Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2019). Fluorescence determination of cochineal in strawberry jam in the presence of carmoisine as a quencher by means of four-way PARAFAC decomposition. *Food Chemistry*, 290:178–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.113>
- Russell, P. E. (2008). Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. *Outlooks on Pest Management*, 17(3).
- Saito, S., Michailides, T. J., Xiao, C. L. (2016). Fungicide resistance profiling in *Botrytis cinerea* populations from blueberry in California and Washington and their impact on control of gray mold. *Plant Disease*, 100:2087–2093.
- Salazar-Cerezo, S., Martinez-Montiel, N., Cruz-Lopez, M. del C., & Martinez-Contreras, R. D. (2018). Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. *Frontiers in Microbiology*, 9:612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00612>
- Shi, H., Wu, H., Zhang, C., & Shen, X. (2013). Monitoring and characterization of resistance development of strawberry *Phomopsis* leaf blight to fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4):655–660. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0102-6>
- Shi, L. B., Li, Y., Fei, N. Y., Fu, J. F., & Yan, X. R. (2017). First report of *Neopestalotiopsis chrysea* causing twig dieback of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in China. *Plant Disease*, 101(3):506–506. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1282-PDN>
- Shi, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Xue, C., Ma, Y., & Wang, F. (2022). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing calyx and receptacle

- blight on strawberry in China. *Plant Disease*, 106(4):1307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-21-1376-PDN>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2023). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., & Gisi, U. (2000). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 complex of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 56:833–841
- Sierotzki, H., & Scalliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103(9):880–887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>
- Sigillo, L., Ruocco, M., Gualtieri, L., Pane, C., & Zaccardelli, M. (2020). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 102(1):281. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00415-2>
- Simpson, D. (2018). The genomes of rosaceous berries and their wild relatives. In *The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives*. Pp 1-4.
- Solarte, F., Muñoz, C. G., Maharachchikumbura, S. S. N., & Álvarez, E. (2018). Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., causal agents of guava scab in Colombia. *Plant Disease*, 102(1):49–59. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0068-RE>
- Spiegel, J., & Stammeler, G. (2006). Baseline sensitivity of *Monilinia laxa* and *M. fructigena* to pyraclostrobin and boscalid. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(5):199–206. <https://doi.org/10.1007/BF03356181>
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., Yan, J., Zhang, W., & Li, X. (2021). Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Protection*, 147:105710. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105710>
- Suwannarach, N., Kumla, J., Bussaban, B., & Lumyong, S. (2012). New report of leaf blight disease on eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) caused by

- Pestalotiopsis virgatula* in Thailand. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(2):306–209. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.680501>
- Tanapichatsakul, C., Khruengsai, S., Monggoot, S., & Pripdeevech, P. (2019). Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves. *PeerJ, Microbiology*, 12 (7):e6427. <https://doi.org/10.7717/peerj.6427>
- Tang, J., Lai, L. X., Du, Y. L., & Yang, Q. (2021). First report of *Neopestalotiopsis protearum* causing seed rot on *Camellia oleifera* in China. *Plant Disease*, 105:4152 <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2717-PDN>
- Taylor, N., & Cuniffe, N. (2022). Modelling quantitative fungicide resistance and breakdown of resistant cultivars: designing integrated disease management strategies for *Septoria* of winter wheat. *BioRxiv. Comput Biol* 19(3): e1010969.
- Tejesvi, M. v, Nalini, M. S., Mahesh, B., Prakash, H. S., Kini, K. R., Shetty, H. S., & Subbiah, V. (2007). New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Bol. Soc. Quím. Méx*, 1(1):19–26.
- Undurraga, P., & Vargas, S. (2013). Manual de Arandano. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. pp: 263.
- Van Hemelrijck, W., Ceustermans, A., Van Campenhout, J., Lieten, P., & Bylemans, D. (2016). Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. In VIII International Strawberry Symposium 1156 (pp. 781-786).
- Vanti, G. L., Leshem, Y., & Masaphy, S. (2021). Resistance response enhancement and reduction of *Botrytis cinerea* infection in strawberry fruit by *Morchella conica* mycelial extract. *Postharvest Biology and Technology*, 175:111470. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111470>
- Veloukas, T., Markoglou, A. N., & Karaoglanidis, G. S. (2013). Differential effect of SdhB gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 97(1):118–122. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0322-RE>
- Vieira, W. A. dos S., Lima, W. G., Nascimento, E. S., Michereff, S. J., Reis, A., Doyle, V. P., & Câmara, M. P. S. (2017). Thiophanate-methyl resistance and fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from banana in Brazil. *Plant Disease*, 101(9):1656–1665. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1594-RE>

- Wang, L., Chen, Y., Zhang, J., Gao, J., Wang, Q., & Chen, H. (2019). Determination of the baseline sensitivity distribution and resistance risk assessment of *Botrytis cinerea* to azoxystrobin in China. *Crop Protection*, 117:16-22.
- Watanabe, K., Motohashi, K., & Ono, Y. (2010). Description of *Pestalotiopsis pallidotheae*: A new species from Japan. *Mycoscience*, 51(3):182–188. <https://doi.org/10.1007/s10267-009-0025-z>
- Wu, Q., Ni, M., Dou, K., Tang, J., Ren, J., Yu, C., & Chen, J. (2018). Co-culture of *Bacillus amyloliquefaciens* ACCC11060 and *Trichoderma asperellum* GDFS1009 enhanced pathogen-inhibition and amino acid yield. *Microbial Cell Factories*, 17(1):155. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1004-x>
- Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., & Chung, P. C. (2021). First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease*, 105(2):487–487. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1045-PDN>
- Xu, J., Yang, X., & Lin, Q. (2014). Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. *Fungal Diversity*, 66(1):37-68. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0288-3>
- Yamada, K., & Sonoda, R. (2012). Characterization of moderate resistance to QoI fungicides in *Pestalotiopsis longiseta* and polymorphism in exon-intron structure of cytochrome b gene. *Journal of General Plant Pathology*, 78(6):398–403. <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0404-8>
- Yang, L. N., He, M. H., Ouyang, H. B., Zhu, W., Pan, Z. C., Sui, Q. J., Shang, L. P., & Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology*, 19(1):205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., & Iwata, S. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299(5607):700–704. <https://doi.org/10.1126/science.1079605>
- Yuan, Z. Q., & Mohammed, C. (1999). Pathogenicity of fungi associated with stem cankers of eucalypts in Tasmania, Australia. *Plant Disease*, 83(11):1063–1069. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.11.1063>

- Zaffarano, P. L., McDonald, B. A., & Linde, C. C. (2016). Two-point mutations in cytochrome b associated with Qol resistance in *Cercospora beticola* from sugar beet. *Phytopathology*, 106(6):632–641. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-15-0319-R>
- Zhang, Y. M., Maharachchikumbura, S. S. N., Tian, Q., & Hyde, K. D. (2013). *Pestalotiopsis* species on ornamental plants in Yunnan Province, China. *Sydowia*, 65(1):113–128.
- Zuniga, A. I., Oliveira, M. S., Rebello, C. S., & Peres, N. A. (2020). Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to isofetamid compared to other SDHIs. *Plant Disease*, 104(4):1224–1230. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1140-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-06-19-1140-RE_T4.JPEG

CAPÍTULO II

DISTRIBUCIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE AISLADOS DE *Neopestalotiopsis* spp. OBTENIDOS DE FRESA A FUNGICIDAS DE DIFERENTE MODO DE ACCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La mancha y tizón foliar de la fresa, es causado por *Neopestalotiopsis* spp., una de las especies de mayor importancia es *N. rosae*, especies que se ha asociado a esta enfermedad en este cultivo en diferentes partes del mundo (Ayoubi & Soleimani, 2016; Chamorro et al., 2016; Gilardi et al., 2019; Ma et al., 2023; Rebollar-Alviter et al., 2020; Wu et al., 2021). *Neopestalotiopsis rosae* fue aislado de tallos de *Rosa* sp. en Nueva Zelanda (Maharachchikumbura et al., 2014), el análisis filogenético se basó en la secuencia del gen 28S (nrRNA), ITS, *tef-1 α* y *tub2* (Maharachchikumbura et al., 2014; Hyde et al., 2019). Posteriormente fue asociado a fresa, reportado por Essa (2018), enfermedad que comenzó a causar daños de importancia económica en el cultivo (Lawrence et al., 2023; Ma et al., 2023; Rebollar-Alviter et al., 2020; Sun et al., 2021; Wu et al., 2021).

Con base a estudios filogenéticos se determinó que *N. rosae*, se ha asociado a otras especies (Baggio et al., 2021), primeramente, se reportó por Camilli et al. (2002) como *Pestalotiopsis longisetula*, causando pudrición de la fruta de la fresa, posteriormente en Brasil (Rodrigues et al., 2014; Teixeira et al., 2015) y *N. clavispora* en España causando pudrición de la corona (Chamorro et al., 2016), las cual se identificaron con la región ITS (región que es informativa para separar especies).

Además de los daños en la parte aérea, *Neopestalotiopsis rosae* causa pudrición de raíz y corona de la fresa, en las cuales puede estar solo o en conjunto con otros hongos como *Phytophthora cactorum*, *F. oxysporum*, *N. solani*, *V. dahliae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. fragariae* (Baggio et al., 2021; Parikka & Latvala,

2021; Widyaningsih & Triasih, 2021; Widyaningsih & Triasih, 2021), lo que hace que los síntomas de pudrición de la corona y la raíz sean similares entre *Neopestalotiopsis* y *Colletotrichum* y *Phytophthora* (Baggio et al., 2021).

La enfermedad puede ser de gran importancia en especial en condiciones de alta humedad relativa y durante el período de lluvia, eventos que favorecen su dispersión por el salpique en condiciones de campo abierto, ya que el hongo produce acérvulos en la superficie infectada de la hoja, las temperaturas óptimas que van de los 25 a 30 °C para su desarrollo (Baggio & Peres, 2020; Rebollar-Alviter et al., 2020). El hongo también puede propagarse a través de la maquinaria agrícola y los trabajadores de campo (Baggio & Peres, 2020).

Hasta ahora, la enfermedad se ha manejado mediante la integración de diferentes tácticas, entre las que se encuentran las culturales que incluyen plántula libre del hongo, desinfestación del suelo, limpieza y desinfestación de maquinaria agrícola, uso de riegos ligeros, nutrición balanceadas y solarización (Baggio & Peres, 2020). El uso de técnicas biológicas como el uso de *Trichoderma asperellum*, *T. konikgiopsis*, *T. harzianum* (Widyaningsih & Triasih, 2021) y bacterias de control biológico como *Bacillus amyloliquefasciens* manera preventiva, y el uso de fungicidas de diferente modo de acción como difenoconazol, propiconazol, fludioxonil+cyprodinil, iprodiona, fluazinam y carbendazim+mancozeb, los cuales en estudios previos realizados en Mexico, EE. UU. e India, en diferentes especies de *Neopestalotiopsis* han inhibido su crecimiento (Baggio et al., 2022; Biju et al., 2018; Rebollar-Alviter et al., 2020).

A pesar de que existen fungicidas con potencia de prevenir el desarrollo de la enfermedad, su uso intensivo puede dar origen al desarrollo de resistencia (Baggio et al., 2022). La resistencia es un fenómeno que puede depender del impacto de las propiedades de cada ingrediente activo y la estructura genética de las poblaciones de hongos, como también de las prácticas de manejo agronómico (Yang et al., 2019), o presente en una población de hongos, incluso antes de usarse, puede

surgir como resultado de la selección continua de poblaciones de patógenos expuestas a fungicidas (Hahn, 2014). En especial en fungicidas de acción específica como el azoxystrobin, que inhibe la respiración mitocondrial en los hongos y boscalid actúa específicamente en la enzima SDH (Succinato Deshidrogenasa), que es importante para la producción de energía en la mitocondria de los hongos.

La determinación de los niveles de sensibilidad de las poblaciones de hongos se realiza a través de bioensayos *in vitro*, con base en la inhibición de crecimiento micelial o inhibición de esporas, una dosis discriminadora se determina por la población específica y fungicida (Lehner et al., 2015; Egüen et al., 2016), de esta manera se optimiza la dosis aplicada de acuerdo con el grado de presión de la enfermedad (Jorgensen et al., 2017).

En general, se considera que la resistencia a los fungicidas se distribuye en dos tipos de curvas: unimodal y bimodal. En la distribución unimodal, la población de hongos sensibles se encuentra en la parte izquierda de la curva y la población de hongos resistentes en la parte derecha, lo que indica que hay una sola población de hongos con diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas. Y en la distribución bimodal, la curva se divide en dos poblaciones distintas, una población de hongos sensibles y otra de hongos resistentes, lo que indica que la población de hongos está compuesta por dos grupos distintos con diferentes niveles de sensibilidad a los fungicidas (Russell, 2008).

Los métodos de monitoreo de la FRAC son herramientas esenciales para evaluar la resistencia de los hongos a los fungicidas. Estos métodos incluyen pruebas de sensibilidad *in vitro*, pruebas de bioensayo en campo, técnicas moleculares y vigilancia epidemiológica. De las cuales las pruebas de sensibilidad, se expone el hongo a diferentes dosis del fungicida en condiciones de laboratorio, bioensayos en campo se mide la eficacia de los fungicidas en el control de los hongos, técnicas moleculares como la detección de mutaciones en genes específicos asociados con la resistencia a los fungicidas y la vigilancia epidemiológica implica la recolección

de muestras de hongos y posterior su análisis para determinar la presencia de resistencia a fungicidas (Brent & Hollomon, 2007).

De acuerdo con técnicas moleculares, Baggio et al. (2021, 2022) confirmó la mutación puntual G143A en *N. rosae* en fungicidas QoI, específicamente azoxystrobin. Este reporte sugiere la existencia de mutaciones previas a fungicidas que confieren ya una resistencia a *Neopestalotiopsis* spp. en pruebas de sensibilidad (Biju et al., 2018; Rebollar-Alviter et al., 2020).

En México, la enfermedad se reportó por primera vez en Zamora, Michoacán por Rebollar-Alviter et al. (2020). Estudios realizados *in vitro*, sugieres que existe una sensibilidad diferencial entre los aislados de *Neopestalotiopsis* spp. que se manifiesta como variaciones en la eficacia en campo. Dada la importancia de conocer el estatus de la sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. obtenidos de diferentes zonas productoras de fresa del centro de México, se realizó el presente estudio con los siguientes objetivos: a) determinar la distribución de la sensibilidad de *Neopestalotiopsis* spp. a fungicidas de diferente modo de acción y su relación con la patogenicidad en fresa, b) caracterizar las mutaciones de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. en relación con su respuesta a fungicidas de diferente modo de acción.

Estos resultados contribuirán diseñar estrategias de manejo integrado de la enfermedad considerando el nivel de sensibilidad de los aislamientos a diferentes fungicidas de diferente modo de acción.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación del estudio y aislados

Los aislamientos monoconidiales utilizados en este estudio fueron proporcionados por el Centro Regional Centro Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo en Morelia, Michoacán de estudios previos. Dichos aislamientos se obtuvieron a partir de diferentes variedades de fresa en estudios previos (Acosta-González, no publicado) (Cuadro 2), colectados en distintas zonas geográficas de Michoacán, Guanajuato, Estado de México, Puebla y Jalisco (Figura 1). En este estudio se utilizaron 264 aislamientos para la prueba de sensibilidad, los cuales fueron previamente identificados a nivel de género y otros a especies se realizó mediante la técnica High Resolution Melting (HRM), con iniciadores diseñados del gen β -tubulina (Neo_Tub2_A1F/AR1 y Neo_Tub2_B1F/B1R) (Acosta-González, 2022). Dichos aislamientos se conservaron en glicerol al 30% a una temperatura de -20 °C.

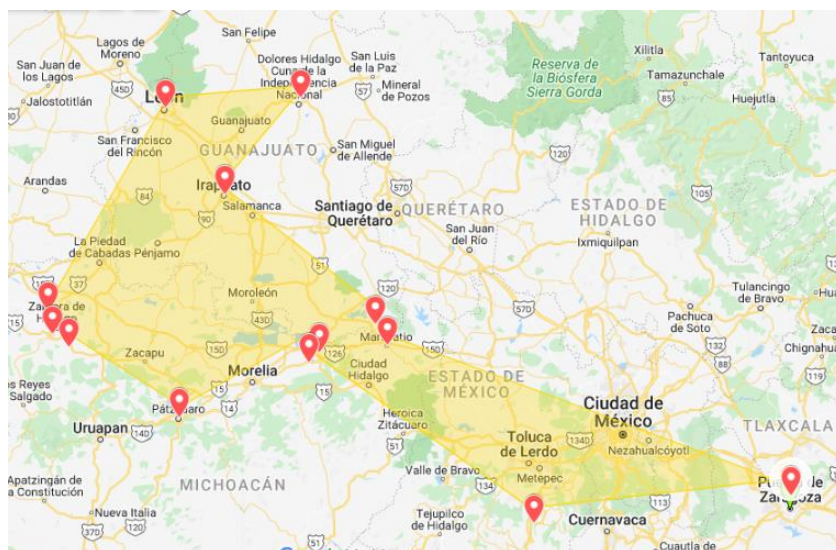


Figura 1. Zonas de colecta de material vegetal para el estudio en las zonas productoras de fresa de los estados de Michoacán, Guanajuato, Estado de México, Puebla y Jalisco (imagen generada por Google Maps).

Cuadro 2. Origen de los aislados y variedades de donde se obtuvieron los aislados de *Neopestalotiopsis* spp.

Estado	Municipio	Variedades
Michoacán	Zamora	Fortuna, Palmeritas, Sayulita, Sensation, Frontera, San Andrea, Calderón, Liliana y Festival
	Jacona	Cabrillo y Fortuna
	Tangancícuaro	Rociera y Sayulita
	Maravatío	Albión
	Queréndaro	Cabrillo
	Zinapécuaro	Cabrillo
	Pátzcuaro	Albión, Sayulita
Edo de México	Villa Guerrero	Albión y Camino Real
Guanajuato	Irapuato	Camino Real
	Tarandacuao	Fortuna, Albión, Cabrillo, Monterrey, Cabrillo, 14-90 y Camino Real
	Dolores Hidalgo	Sayulita
	León	San Andrea
Puebla	Puebla	Albión
Jalisco	Zapotlán	Albión, Camino real, San Andreas y Frontera

2.2 Preparación e incremento del inóculo de *Neopestalotiopsis* spp.

Los aislamientos se reactivaron en medio V8 clarificado por 7 d de incubación a 25 °C, ya presentes los acérvulos se añadió 5 mL de agua destilada a la caja Petri y se removieron los acérvalos con una aguja previamente esterilizada con alcohol y flameada por el mechero. Luego, se filtró la solución en un vaso de precipitado con una gasa, siguiendo la técnica modificada de Stammler y Speakman (2006). Se tomaron 200 µL de la suspensión de inóculo para colocarlos en la cámara de Neubauer (Hausser Scientific), posteriormente se contaron los conidios en un microscopio compuesto (ZEISS Primo Star), obteniendo una concentración de 1×10^5 conidios mL⁻¹.

2.3 Fungicidas a evaluar en pruebas de sensibilidad

En el cuadro 3, se muestran los fungicidas evaluados, así como los ingredientes activos, nombre comercial, modo y sitio de acción.

Cuadro 3. Fungicidas evaluados para sensibilidad de *Neopestalotiopsis* spp. (FRAC, 2022).

Código FRAC	Nombre químico	Nombre comercial	i. a. ¹	Grupo químico	Modo de acción	Código y punto de Acción
11	Azoxystrobin	Amistar®	500 g i. a. / Kg	Methoxy-acrylatos	C: Respiración	C3: complejo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cyt b)
7	Boscalid	Cantus®	500 g i. a. / Kg	Piridin-carboxamidas	C: Respiración	C2: complejo II: succinato-deshidrogenasa
3	Difeconazol	Score 250®CE	250 g i. a./ L	Triazol	G: Biosíntesis de esterol en las membranas	G1: C14- demetilasa en la biosíntesis de esteroides (erg11/cyp51)

¹i.a.: concentración de ingrediente activo.

2.4 Preparación de solución stock de los fungicidas

El cálculo de la solución stock se realizó con base al ingrediente activo de cada uno de los fungicidas en 100 mL de agua destilada. En el caso del fungicida azoxystrobin se añadió 100 mg de ácido salicilhidroxámico (SHAM, 99% i. a.; Sigma-Aldrich) diluido en etanol absoluto al 100% para posteriormente adicionar en las soluciones madre, con el fin de inhibir la vía de respiración alternativa (Rebollar-Alviter et al., 2007; Amiri et al., 2013a), la cual se expresa en el crecimiento micelial de hongos. Para el fungicida difenoconazol y boscalid también la solución stock se realizó en 100 mL de agua destilada.

2.5 Validación de método de dilución de gradiente en espiral

Previo a realizar las pruebas de sensibilidad por esta técnica, se seleccionó un grupo de 6 aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. de diferentes zonas y variedades (Cuadro 4) los cuales fueron probados en diferentes métodos y fungicidas. Los métodos y que se probaron se describe a continuación:

Cuadro 4. Aislamientos seleccionados de *Neopestalotiopsis* spp. para la validación de métodos para determinar la sensibilidad a fungicidas.

No. Asignado	No. Identificación	Municipio	Variedad
17	FREC1184	Zamora	Sayulita
38	FREC1580	Zamora	Fortuna
58	FRER239	Tarandacuao	Albión
63	FREC410	Tarandacuao	Albión
196	FRIC17	Abasolo	Fortuna
198	FRIR19	Tarandacuao	Albión

2.5.1 Prueba de sensibilidad *in vitro* en medio enmendado con fungicidas

En la preparación de medios envenenados para el set de cepas (Cuadro 4), se realizaron 4 repeticiones por dosis (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL) en la caja petri de 90 mm, de los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol. la dosis correspondiente del fungicida se agregó al medio PDA al estar enfriado a una temperatura de 50 °C. Sobre el medio solidificó se colocaron sacabocados de micelio de 5 mm, obtenidos del borde de las cepas de *Neopestalotiopsis* spp. con 7 d de crecimiento, luego se incubaron a 25 °C, por 7 d hasta que el control (sin fungicida) llenó la caja, tiempo en el que se realizó la medición del diámetro de la colonia en dos sentidos de manera perpendicular a los 7 d después de la siembra.

2.5.2 Prueba de sensibilidad *in vitro* mediante microtitulación

En placas de microtitulación se depositaron las diferentes dosis de los fungicidas mencionados anteriormente y la concentración del inóculo (1×10^5 mL). Para este método las dosis de fungicidas fueron al doble (0.002, 0.02, 0.2, 2, 20 y 200 mg L⁻¹) (Rebollar-Alviter et al., 2007) con el fin de que las dosis quedaran a 0.001, 0.01, 0.2, 1, 10 y 100 µg mL⁻¹ al momento de mezclar la concentración de inóculo en los pocillos de la placa. Se depositó 100 µL por cada dosis del fungicida como control

(blanco), luego 100 μ L de fungicida más 100 μ L de inóculo en cada repetición por cada dosis, se realizaron 4 repeticiones. Posteriormente las placas se colocaron en bolsas de plástico para evitar la evaporación, a 25 °C por 12 h luz (Stammiller & Speakman, 2006). En el caso del azoxystrobin se envolvió en papel aluminio para evitar la foto degradación del fungicida.

Después de 5 d de incubación de las placas, se midió la absorbancia de los tratamientos utilizando un lector de microplacas (software Microplate Manager® 6, BIO-RAD) a una longitud de onda de 405 nm por 15 s, se restó el valor de absorbancia del blanco.

La estimación de la CE_{50} para los métodos descritos, se realizó mediante el ajuste del modelo Log-Logístico, con asíntota superior como lo menciona Rebollar-Alviter & Ellis (2005).

2.5.3 Prueba de sensibilidad *in vitro* de dilución en gradiente en espiral

El método se realizó con el equipo de gradiente en espiral Eddy Jet® 2W (IUL Instruments, Barcelona, España). Primeramente, en cajas contenido PDA, se colocaron bandas de celofán (40 mm de largo $\times$ 3 a 4 mm de ancho) previamente esterilizadas por 15 min a 121 °C, las cuales se inocularon con 10 μ L de inóculo (1×10^5 mL), se incubaron a 25 °C durante 24 h. Para simplificar el proceso de inoculación, se verificó que el mismo resultado se obtuvieron al colocar las tiras de celofán directamente en la cepa y al incubar en las mismas condiciones, se acabó simplificar el proceso de inoculación.

Para la dilución de los fungicidas se utilizaron cajas de 90 mm conteniendo medio PDA. Luego, a partir de una solución madre de azoxystrobin (5000 mg L⁻¹), boscalid (20000 mg L⁻¹) y difenoconazol (100 mg L⁻¹) en 100 mL de agua destilada, la cual se determinó mediante el método convencional, en el azoxystrobin como anteriormente se mencionó se agregó 100 mg de ácido salicilhidroxámico (SHAM, 99% i. a.; Sigma-Aldrich) diluido en etanol absoluto al 100%. Con el equipo Eddy

Jet® 2W se diluyó el fungicida, seleccionando por modo logarítmico siguiendo el método descrito por Förster et al. (2004), las cajas Petri se incubaron en cámara de flujo laminar (LABCONCO) por 12 h para el secado y difusión del fungicida en el medio PDA. Posteriormente, se eliminó el centro del medio (libre de fungicida) con un sacabocados (20 mm de diámetro) previamente esterilizado (Amiri et al., 2013b; Forcelini et al., 2016; Förster et al., 2004).

Transcurridas las 12 h de la incubación de las cajas con fungicida se colocaron 4 tiras de celofán cubiertas con micelio por caja, con tres repeticiones por cada aislamiento. Luego, se incubaron las cajas a temperatura ambiente por 48 a 72 h, persiguiendo el crecimiento del micelio. Este proceso experimental se llevó a cabo en dos ocasiones.

La medición del crecimiento micelial, se realizó la medición con el programa ImageJ (disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/>), midiendo la distancia a la concentración mínima inhibitoria (MIC, concentración mínima del fungicida en la cual el hongo mantiene un crecimiento uniforme) y la concentración de inhibición total (TIC, concentración a la cual más se inhibe completamente el crecimiento del hongo) y la concentración efectiva 50 (CE₅₀) del micelio, tal y como se muestra en la Figura 2. Además, también se midió la altura del medio de agar (AH), siguiendo el método descrito por Torres-Londoño et al. (2016).

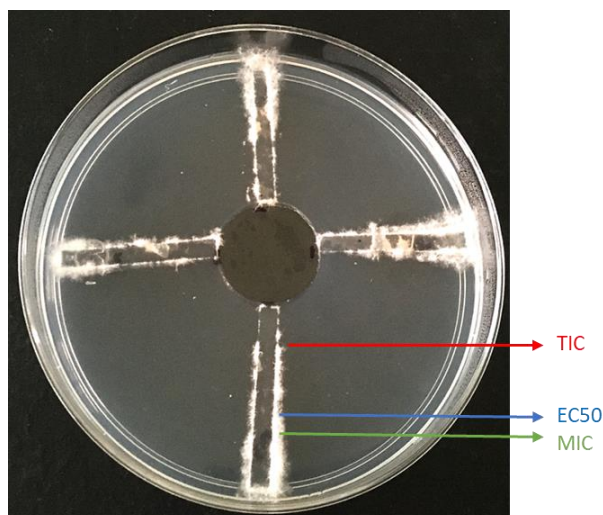


Figura 2: Medición radial del crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. expuesto a la concentración mínima inhibitoria (**MIC**), Concentración efectiva 50 (**EC50**) Y concentracion de inhibición total (**TIC**).

Estas variables son necesarias para estimar la CE_{50} con base en las mediciones radiales de la MIC, EC_{50} y TIC. La EC_{50} se estimó mediante el método descrito por Torres-Londoño et al. (2016) y el paquete ECX desarrollado en R (<https://www.r-project.org/>) por el mismo autor utilizando la función *Ecal*, para un solo aislamiento, o *multi* para una tabla (aplicación shiny) con múltiples aislamientos. Los parámetros necesarios para calcular la EC_{50} son:

Ecal (rad1=a, rad2=b, EC=c, mx=x, pp=y, AH=z)

Donde **a** representa la distancia (mm) la concentración inhibitoria total (TIC), **b** la distancia a la concentración inhibitoria máxima (MIC), **c** es la distancia a concentración efectiva 50 observada, **x** es el peso molecular del fungicida a utilizar, **y** es la concentración en partes por millón de la solución stock del fungicida, y **z** es la altura del agar.

La determinación de las concentraciones efectivas del 50% se llevó a cabo mediante la representación gráfica de la tasa de crecimiento en función de las concentraciones logarítmicas del fungicida. Para ilustrar la distribución de la sensibilidad, se generaron diagramas de caja e histogramas de los valores de EC_{50} .

Una vez que demostró la correlación entre los métodos convencional, microtitulación y gradiente en espiral, se procedió a realizar el análisis con el sembrador en espiral del resto de los aislados de *Neopestalotiopsis* spp. (264) y la estimación de la CE_{50} se realizó utilizando la función *multi* del mismo paquete (ECXv4.0) (<https://github.com/GabrielTorres/ECX>).

Con las estimaciones de la CE_{50} , de cada uno de los métodos, se realizó un análisis de varianza considerando a los aislamientos como repeticiones y a los fungicidas y métodos como factores. Dicho análisis se desarrolló como se indicó previamente, considerando a los fungicidas y métodos como factores fijos y a los aislamientos como factor aleatorio. El análisis se realizó con el procedimiento GLIMMIX del programa SAS.

2.6 Categorización de aislamientos por su nivel de resistencia

A partir de las estimaciones de la EC_{50} mediante el método de sembrador en espiral, se seleccionaron 15 aislamientos y se definieron 3 categorías: sensible, medianamente resistentes y resistentes ampliados por la EC_{50} obtenidos para cada fungicida. Para establecer los niveles de sensibilidad de cada aislamiento frente a los fungicidas evaluados, se tomaron como estudios de referencia anteriores (Cuadro 5).

Con esto, se buscó establecer los niveles de sensibilidad de cada aislamiento frente a los fungicidas evaluados. De azoxystrobin y difenoconazol se seleccionaron 3 aislados sensibles (siendo sensibles para ambos fungicidas) y medianamente resistentes para boscalid, 9 aislados medianamente resistentes para azoxistrobin, resistentes para boscalid y sensibles para Difenconazol, y por último 3 aislados resistentes para azoxystrobin y boscalid y sensibles para difenoconazol.

Para el fungicida metil-tiofanato se determinó la CE_{50} de 30 aislamientos, los cuales son resistentes a $>50 \text{ mg mL}^{-1}$ (resultados no mostrados), además, se determinó la

resistencia de algunos aislamientos con amplificación del gen β -tubulina y prueba de patogenicidad (Figuras 12 y 18).

Cuadro 5. Grado de sensibilidad a fungicidas con base en la CE_{50} .

Referencia	Fungicida	Sensible (mg mL ⁻¹)	Medianamente resistente (mg mL ⁻¹)	Resistente (mg mL ⁻¹)
Yin et al. (2015)	Azoxystrobin	0.02 y 2.5	2.5 a 6.1	6.1 a 1233.6
Veloukas et al. (2011)	Boscalid	0.05 a 0.21	1.37 a 7.79	>50
Rosenzweig et al. (2019)	Difenoconazol	<0.01	0.01-1	>1

2.7 Detección de mutaciones en aislamientos con respuesta diferencial a fungicidas

Después de determinar la CE_{50} en 264 aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. mediante el método gradiente en espiral, seleccionar 15 aislamientos con base en los criterios mencionados en el punto anterior, se procedió primeramente a corroborar la identificación filogenética de las especies como se describe a continuación, utilizando los primers que amplifican las regiones que se describen en el Cuadro 6.

2.7.1 Extracción de DNA por método CTAB 2%

Los 15 aislamientos seleccionaron se crecieron medio V8 clarificado. Después de 7 d de crecimiento, se procedió a la extracción de DNA de las cepas en estudio. Para ello, micelio del hongo y se maceraron con un mortero. Luego, se aplicó directamente 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0) (Doyle & Doyle, 1991; Fuentes-Aragón et al., 2020).

La suspensión resultante se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó en un baño María a 95 °C durante 90 min. A continuación, se agregaron 700 μ L de cloroformo-

isoamílico y se centrifugó a 11,500 *g* durante 10 min. Posteriormente, se realizó un lavado adicional con 500 μ L de cloroformo-isoamílico. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y los ácidos nucleicos se precipitaron durante 1 h a -20°C con 0.6 volúmenes de isopropanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M. Luego, trascurrido el tiempo se centrifugó a 11.500 *g* durante 30 minutos. El micro-pellet se lavó con 600 μ L de isopropanol al 70% (en dos ocasiones) y se secó al vacío en una campana de flujo (LABCONCO).

2.7.2 Amplificación por PCR para genes multilocus

La concentración del DNA se determinó mediante espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), revisando la calidad del DNA de absorbancia de A260/230 y A260/280 entre 1.8 y 2.2. La amplificación por PCR se llevó a cabo utilizando Buffer 5 $\times$, dNTP's (2.5 μ M), primers For y Rev (10 pM) (Cuadro 6) y *Taq* DNA Polimerasa (5U), y DNA (20 ng) molde en 15 μ L en total volumen de reacción.

Cuadro 6. Iniciadores utilizados para la identificación filogenética de *Neopestalotiopsis* spp.

Locus	Primers	Secuencia	Referencia
<i>rpb2</i>	RPB2 5f2	5'-GGG GWG AYC AGA AGA AGG C- 3'	Sung et al. (2007)
	RPB2 7cr	5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-5'	Liu et al. (1999)
LSU	LROR	5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3'	Rehner & Samuels (1994)
	LRS	5'- TCC TGA GGG AAA CTT CG-3'	Vilgalys & Hester (1990)
ITS	ITS 5	5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G- 3'	White et al. (1990)
	ITS 4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	
<i>tub-2</i>	T1	5'- AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'	Glass y Donaldson, (1995);
	BT2b	5'- ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'	O'Donnell & Cigelnik (1997)
<i>tef-1</i>	EF1-688F	5'- CGG TCA CTT GAT CTA CAA GTG C-3'	O 'Donnell et al., (1998);Carbone & Kohn, (1999)
	EF1-1251R	5'- CCT CGA ACT CAC CAG TAC CG -3'	

ITS: espaciadores transcritos internos, 5.8S; **LSU:** subunidad larga del rDNA 28S; ***rpb2*:** segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II dirigida por DNA; ***tef-1*:** factor de elongación de la traducción 1-alfa; ***tub2*:** gen parcial de β -tubulina.

Las condiciones de ciclos térmicos se utilizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, la alienación a 51, 55, 59 y 58 °C (LSU, *tub2*, *tef-1 α* , ITS y *rpb2*), 2 min de extensión a 72 °C y un ciclo final de extensión a 72 °C por 5 min. Las condiciones del ciclo de PCR se llevaron a cabo en el termociclador C1000 Touch® (BIO-RAD). Las condiciones óptimas para la amplificación por PCR para cada una de las regiones a amplificar pueden variar.

2.7.3 Electroforesis

Después de la PCR, se verificó la calidad y tamaño de los fragmentos de amplificación por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% (SeaKem, USA), teñido con Gel red 6X y corrido a 90 volts por 90 min. Para visualizar las bandas de PCR, se utilizó un trasluminador infinity3026 WL/LC/26MX 127 (Vilber

Lourmant, Alemania). Para la limpieza de los PCR, se empleó la enzima ExoSAP-IT™ (Affymetrix, EE. UU.), siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante. Posteriormente, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Psomagen (Maryland, EE. UU.), en ambas direcciones (*forward* y *reverse*).

2.7.4 Análisis filogenético

Las secuencias consenso se encuentran referenciadas en el Cuadro 7. Las secuencias de DNA de ambas cadenas se ensamblaron con el software BioEdit (Sequence Alignment Editor v 7.0.5) (Hall, 1999). El árbol filogenético se generó mediante secuencias combinadas de la región espaciadora transcrita interna (ITS) constó de 26 secuencias de especies de los géneros *Pestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* (Maharachchikumbura et al. 2014; Liu et al., 2019b) para asignar los aislamientos de este estudio. La inferencia Bayesiana (BI) se llevó a cabo mediante cuatro ejecuciones de Markov Chains Monte Carlo (MCMC) en el software MrBayes v 3.2.1. (Ronquist et al. 2012), se ejecutó a partir de árboles aleatorios durante 1.5 millones de generaciones y se tomaron muestras cada 1000 generaciones, eliminándose 25% de los árboles generados (3002), de los cuales 2252 se usaron para el cálculo del PP (probabilidad posterior). El árbol filogenético se enraizó con la secuencia de *Sordaria tomento-alba* CBS 260.70, la desviación estándar de las frecuencias de división fue de 0.007136.

Cuadro 7. Secuencias de referencia utilizadas para el análisis filogenético con su número de acceso de GenBank.

organismo	Número cepa	de	País	Hospedante	Número de acceso GenBank				
					LSU	ITS	tub2	tef-1 α	rpb2
<i>N. clavispora</i>	IHI 201606		Germany	Leaf forest	JAANBA010 000575	MT151848	JAANBA01000 0111	JAANBA01 0000172	JAANBA01 0000002
<i>N. cubana</i>	CBS 600.96 ^T		Cuba	Leaf litter	KM116253	KM199347	KM199438	KM199521	MH554973
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 264.37 ^T		----	<i>Eucalyptus globulus</i>	NG_069223	MH855907	KM199431	KM199551	MH554935
<i>N. surinamensis</i>	CBS 450.74 ^T		Zimbabw e	<i>Protea eximia</i>	NG_069224	NR_145240	KM199465	KM199518	MH554962
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 336.86 ^T		Iraq	<i>Pinus brutia</i>	KM116271	KM199362	KM199441	KM199555	MH554944
<i>N. rosae</i>	CBS 101057 ^T		New Zealand	<i>Rosa</i> sp.	KM116245	KM199359	KM199429	KM199523	MH554850
<i>P. australasiae</i>	CBS 114126 = CPC 2896 ^T		New Zealand	<i>Knightia</i> sp.	KM116218	KM199297	KM199409	KM199499	MH554867
<i>P. grevilleae</i>	CBS 114127 = CPC 2919 ^T		Australia	<i>Grevillea</i> sp.	KM116212	KM199300	KM199407	KM199504	MH554868
<i>P. kenyana</i>	CBS 44267 ^T		Kenya	<i>Coffea</i> sp.	KM116234	KM199302	KM199395	KM199502	MH554958
<i>P. knightiae</i>	CBS 114138 ^T		Nueva Zelanda	<i>Knightia</i> sp.	KM116227	KM199310	KM199408	KM199497	MH554870
<i>P. portugallica</i>	CBS 393.48 ^T		Portugal	-----	NG069216	NR_147556	KM199422	KM199510	MH554951

<i>P. oryzae</i>	CBS 353.69 ^T	Denmark	<i>Oryza sativa</i>	KM116221	KM199299	KM199398	KM199496	MH554947
<i>P. parva</i>	CBS 278.35 ^T	---	<i>Leucothoe fontanesiana</i>	KM116205	KM199313	KM199405	KM199509	MH554939
<i>Pse. cocos</i>	CBS 272.29 ^T	Indonesia	<i>Cocos nucifera</i>	MH866532	MH855069	KM199467	KM199553	MH554938
<i>Truncatella angustata</i>	CBS 144025 ^T	France	<i>Vitis vinifera</i>	MH554318	MH554112	MH554785	MH554546	MH555021

T: ex-tipo.

El análisis multilocus (*tef-1 α* , *tub2*, ITS, *rpb2* y LSU) constó de 30 secuencias y 3,843 caracteres; se corrió a 2.5 millones iteraciones (SDSF = 0.006257), los modelos TVM, TrN, TrNef, TPM1uf y TPM3uf se reemplazaron con el modelo GTR para el análisis de inferencia bayesiana (IB) (Lecocq et al., 2013), con el modelo GTR+I para ITS, LSU, *tub2*, y *tef-1 α* , y modelo GTR+r para *rpb2* (Cuadro 8), generando 5002 árboles, de los cuales 3752 se utilizaron para calcular los PP.

Cuadro 8: Modelos de sustitución nucleotídica de región ITS y secuencias parciales de los genes, LSU, *rpb2*, *tef-1 α* y *tub2*.

Región/Gen ¹	Número de caracteres (pb ²)	Modelo de sustitución nucleotídica	Modelo equivalente para bayesianos
ITS	579	TVM + I	GTR + I
LSU	895	TrN + I	GTR + I
<i>rpb2</i>	994	TrNef + G	GTR + Γ
<i>tef-1α</i>	608	TPM1uf + I	GTR + I
<i>tub2</i>	767	TPM3uf + I	GTR + I

¹ITS: espaciadores transcritos internos, 5.8S; LSU: subunidad larga del rDNA 28S; *rpb2*: segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II dirigida por DNA; *tef-1*: factor de elongación de la traducción 1-alfa; *tub2*: gen parcial de β -tubulina. ² pb = pares de bases.

Mientras que los dos aislamientos agrupados en *Neopestalotiopsis*, se realizó un análisis multilocus con *tef-1 α* , *tub2* y ITS para reagrupar estos aislados. Las secuencias consenso se referencian en el Cuadro 10, por lo que constó de 34 secuencias y 1670 caracteres; Se corrieron 2.5 millones iteraciones (SDSF = 0,003044). Los modelos TVM+I y TPM3uf+r se reemplazaron con el modelo GTR para el análisis de inferencia bayesiana (Lecocq et al., 2013), el modelo GTR+G para *tub2* y *tef-1 α* , y modelo GTR+I para ITS (Cuadro 9), generando 5002 árboles, de los cuales 3752 para calcular los PP.

Cuadro 9. Modelo de sustitución nucleotídica de la región ITS y los genes *tef-1 α* y *tub2*

Región/Gen ¹	Número de caracteres (pb ²)	Modelo de sustitución nucleotídica	Modelo equivalente para bayesianos
ITS	554	TVM + I	GTR + I
<i>tef-1α</i>	628	TPM3uf + Γ	GTR + G
<i>tub2</i>	488	TPM3uf + Γ	GTR + G

¹ITS: espaciadores transcritos internos, 5.8S; *tef-1*: factor de elongación de la traducción 1-alpha; *tub2*: gen parcial de β -tubulina. ² pb = pares de bases.

Cuadro 10. Secuencias de referencia con número de accesoión de GenBank, región ITS y genes (*tef-1 α* y *tub2*) para el análisis filogenético de *Neopestalotiopsis iranensis*

Organismo	Numero de cepa	País	Hospedante	Numero de accesoión GenBank		
				ITS	<i>Tef-1α</i>	β -tubulina
<i>N. asiatica</i>	MFLUCC12-0286 ^T	China	Dead plant material	JX398983	JX399049	JX399018
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC12-0280 ^T	China	Dead plant material	JX398978	JX399044	JX399013
<i>N. coffeae-arabicae</i>	HGUP4019 ^T	China	<i>Coffea arabica</i>	KF412649	KF412646	KF412643
<i>N. ellipsospora</i>	MFLUCC12-0283 ^T	China	Dead plant material	JX398980	JX399047	JX399016
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9123 ^{ET}	China	Mangrove	JX398987	JX399053	JX399022
<i>N. iranensis</i>	CBS 137768	Irán	<i>Fragaria x ananassa</i>	KM074048	KM074051	KM074057
<i>N. cubana</i>	CBS 600.96 ^T	Cuba	Leaf litter	KM199347	KM199521	KM199438
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 336.86 ^T	Iraq	<i>Pinus brutia</i>	KM199362	KM199555	KM199441
<i>N. saprophytica</i>	MFLUCC12-0282 ^T	China	Dead plant material	JX398982	JX399048	JX399017
<i>N. rosae</i>	CBS 101057 ^T	New Zealand	<i>Rosa</i> sp.	KM199359	KM199523	KM199429
<i>P. australasiae</i>	CBS 114126 = CPC 2896 ^T	New Zealand	<i>Knightia</i> sp.	KM199297	KM199499	KM199409
<i>P. kenya</i>	CBS 44267 ^T	Kenya	<i>Coffea</i> sp.	KM199302	KM199502	KM199395
<i>P. knightiae</i>	CBS 114138 ^T	Nueva Zelanda	<i>Knightia</i> sp.	KM199310	KM199497	KM199408
<i>P. oryzae</i>	CBS 353.69 ^T	Denmark	<i>Oryza sativa</i>	KM199299	KM199496	KM199398
<i>P. parva</i>	CBS 278.35 ^T	---	<i>Leucothoe fontanesiana</i>	KM199313	KM199509	KM199405

<i>Pse. cocos</i>	CBS 272.29 ^T	Indonesia: Java	<i>Cocos nucifera</i>	MH855069	KM199553	KM199467
<i>Pse. indica</i>	CBS 459.78 ^T	India	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	KM199381	KM199560	KM199470
<i>Pse. camelliae</i>	LC3490 ^T	China	<i>Camelia sinensis</i>	KX894985	KX895202	KX895316
<i>Truncatella angustata</i>	CBS 144025 ^T	France	<i>Vitis vinifera</i>	MH554112	MH554546	MH554785

T = Ex-tipo; **ET**= Ex-epítipo.

2.7.5 Análisis de mutaciones puntuales

Para el análisis de mutaciones puntuales en los 15 aislamientos seleccionados con diferentes niveles de resistencia a dos fungicidas, se llevó a cabo la extracción de DNA y la amplificación por PCR siguiendo las condiciones descritas anteriormente. Los primers para la región *Cyt b* (citocromo b) y *Tub* (tubulina) se indican en el Cuadro 11. Las condiciones usadas en la PCR fueron previamente reportadas por Ishii et al. (2001) para el gen *Cyt b*, y por Liu et al. (2019a) y Hu et al. (2016) para el gen *Tub*. Los fragmentos amplificados se verificaron mediante electroforesis horizontal, agarosa al 1.5%. El ensamble de las secuencias se realizó con el software BioEdit. Las secuencias obtenidas fueron posteriormente traducidas a proteínas y se analizaron los nucleótidos y los aminoácidos con programa MEGA (v.7.2). Este análisis permitió identificar los SNP y su relación con la resistencia a los fungicidas estudiados.

Cuadro 11. Iniciadores utilizados para la detección de mutaciones en los genes *cyt b* y *tub2* en aislamientos sometidos a los fungicidas azoxystrobin y metil-tiofanato.

Grupo químico	Mutación	Primers	Secuencia (5´- 3´)	bp ¹	Referencia
Metoxi-acrilatos	G143A	RSCBF1	5'-TAT TAT GAG AGA TGT AAA TAA 285		Ishii et al. (2001)
		RSCBR2	5'-AAC AAT ATC TTG TCC AAT TCA TGG-3'		
Benzimidazol	198A/K/V F200Y	TubF1	5´-ACT TCG TCT TCG GCC AGT CTG-3´ 792		Hu et al. (2015)
		TubR1	5´- TTC TGG ACG TTG CGC ATC TG-3´		

¹pb= pares de bases

2.8. Influencia del nivel de resistencia en la patogenicidad de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.

2.8.1 Material vegetal

Los 15 aislamientos seleccionados por su nivel de resistencia y corroborados en su identificación filogenética se inocularon en hoja desprendidas de fresa en un estado de madurez intermedio de la variedad Camila (El pajonal, Tiripetio, Morelia, Michoacán) las cuales se inocularon posterior a la aplicación de los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol.

2.8.2 Fungicidas

Los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol (Cuadro 12) se emplearon las dosis comerciales recomendadas de la ficha técnica del producto para el cultivo de fresa. La concentración aplicada se determinó con base en un volumen de 600 L/ha, posteriormente el fungicida se diluyó en agua destilada estéril.

Cuadro 12. Dosis comerciales de fungicidas recomendadas para el cultivo de fresa.

Nombre comercial	Grupo químico	Nombre químico	Ingrediente activo	Dosis comercial media aplicada
Amistar®	Methoxy-acrylatos	Azoxystrobin	500 g i. a. /kg	400 g/ha
Cantus®	Piridin-carboxamidas	Boscalid	500 g i. a. /kg	1.1 kg/ha
Score 250® CE	Triazoles	Difenoconazol	250 g i. a. /L	1.5 L/ha
Cercobin® M	Benzimidazoles	Metil-tiofanato	700 g i. a./ kg	0.85 kg/ha

2.8.3 Desinfestación de material vegetal

Previo a la aplicación a la aplicación de los fungicidas se llevó a cabo la desinfestación de las hojas utilizando hipoclorito de sodio al 2% por 3 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril en tres ocasiones y se colocaron en sanitas esterilizadas en la campana de flujo laminar (LABCONCO) durante 10 min para su secado. Una vez secas, se sumergieron en las soluciones comerciales de los fungicidas azoxystrobin, boscalid, difenoconazol y metil-tiofanato

por 3 a 5 seg, y se colocaron nuevamente en sanitas esterilizadas 15 min para su secado. Después, se dispuso la cámara húmeda en contenedores de plástico de 18x30x9 cm previamente esterilizado con alcohol al 70%, se colocaron cuatro sanitas, las cuales se humedecen con agua destilada estéril, y se colocaron 10 hojas de fresa por cámara húmeda (5 hojas por tratamiento), ya que se repitió el experimento dos veces. Se colocó un algodón húmedo en la parte del peciolo de cada hoja y se sellaron las cámaras húmedas para mantener las condiciones la humedad relativa al 100% y a temperatura del laboratorio (22 °C).

2.8.4 Inoculación en hojas desprendidas de fresa

Para obtener una concentración de inóculo de 1×10^5 mL conidios, se siguió el procedimiento como se describió previamente.

La inoculación de las cepas se llevó a cabo mediante la aplicación de cinco gotas colocadas con una micropipeta (Rainin H0963468) de manera regulada, cuatro en el margen y uno en el centro de la hoja, cada gota de 10 μ L. Terminado el procedimiento se etiquetaron cada una de las cámaras húmedas con fecha de inoculación, clave de identificación del patógeno y fungicida.

2.8.5 Variables evaluadas

Posterior a la inoculación, se realizaron observaciones de las hojas inoculadas a partir de 12 h, posteriormente 24 h y 36 h, para reconocer los primeros síntomas causados por el agente causal *Neopestalotiopsis* spp. y posteriormente evaluar el Periodo de incubación (Pi). La variable severidad se evaluó a partir de que el testigo alcanzo el 70% de daño en las hojas, con la aplicación Leaf Doctor (<https://apps.apple.com/us/app/leaf-doctor/id874509900>), la cual calcula el porcentaje de severidad de la enfermedad.

2.8.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la severidad fueron analizados mediante un ANOVA y posterior comparación de medias (LSD, $P = 0.05$), usando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System v. 9.4) con el procedimiento Glimmix (Generalized Linear Mixed Models) considerando como efectos fijos los fungicidas y aislamientos, y como efectos aleatorios las repeticiones (hojas de fresa) considerando dos factores (fungicidas y aislados) en un diseño completamente al azar.

3. RESULTADOS

3.1 Validación del método gradiente en espiral por medio envenenado con fungicida y microtitulación

Como se observa en el Cuadro 13, el análisis de varianza entre fungicidas y métodos, considerando a los aislamientos como repeticiones, indicó que la interacción entre ambos factores fue significativa ($P < 0.001$, $F = 6.99$), es decir, la EC₅₀ dependió del fungicida y el método. Sin embargo, dicho resultado estuvo más influenciado por la ligera variación que hubo en el azoxystrobin. Como se observa, tanto de difenoconazol como el boscalid, las estimaciones fueron muy similares entre los métodos. Es probable que estas ligeras diferencias se atribuyen a variaciones en el ajuste de los modelos.

Cuadro 13: Comparación de medias de la EC₅₀ de tres Fungicidas y tres métodos, para evaluar la sensibilidad de seis aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.

Fungicida	Método	Estimación ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Agrupamiento
SE=0.036			
Boscalid	Microtitulación	100	A
Boscalid	G. Espiral	100	A
Boscalid	Medio enmendado	100	A
Azoxystrobin	Microtitulación	10.90	B

Fungicida	Método	Estimación ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Agrupamiento
SE=0.036			
Azoxystrobin	G. Espiral	8.60	D
Azoxystrobin	Medio enmendado	10.0	C
Difenoconazol	Microtitulación	0.02	E
Difenoconazol	G. Espiral	0.01	E
Difenoconazol	Medio enmendado	0.01	E

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

3.2 Sensibilidad de *Neopestalotiopsis* spp. a los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol

Con base en los resultados obtenidos mediante el método gradiente en espiral, se determinó la CE_{50} de los fungicidas Azoxystrobin, Boscalid y Difenoconazol. La distribución de la sensibilidad *in vitro*, la media, mediana y el rango, determinan la discrepancia de los resultados obtenidos, la media (promedio de valores) de CE_{50} fue de $10.004 \mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxystrobin (figura 3), la dosis máxima fue de $15.90 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la mínima de $0.455 \mu\text{g mL}^{-1}$, la mediana fue de $10.147 \mu\text{g mL}^{-1}$ que representa el valor central de la distribución, así determinado la sensibilidad típica, y un rango de 0.5 a $15.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, diferencia entre los valores, el más alto y el más bajo de la CE_{50} .

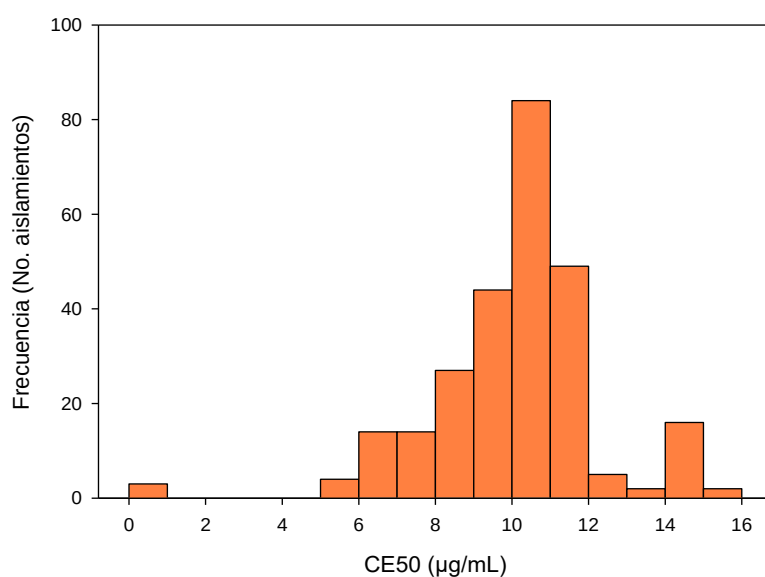


Figura 3. Valores de la CE₅₀ del fungicida azoxystrobin para los aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.

En el fungicida boscalid, se determinó que la media de la CE₅₀ fue de 100.03 µg mL⁻¹ (Figura 4), CE₅₀ máxima fue de 117.70 µg mL⁻¹ y la mínima fue de 17.95 µg mL⁻¹ y una mediana de 101.20 µg mL⁻¹.

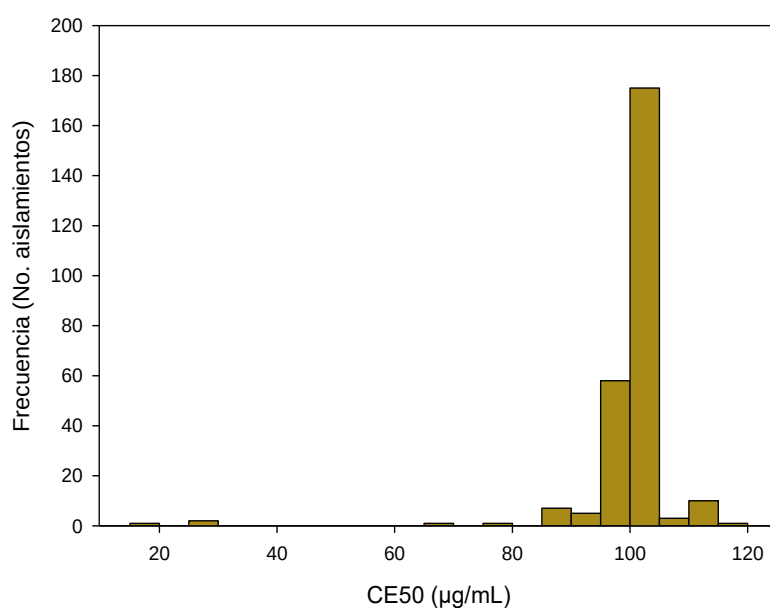


Figura 4. Valores de la EC₅₀ del fungicida boscalid para los aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.

El fungicida Difenconazol, los resultados indicaron la media de CE_{50} fue de 0.01097 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como se muestra en la Figura 5. La CE_{50} de 0.15687 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como máxima, y la CE_{50} mínima de 0.00946 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la mediana en 0.010507 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

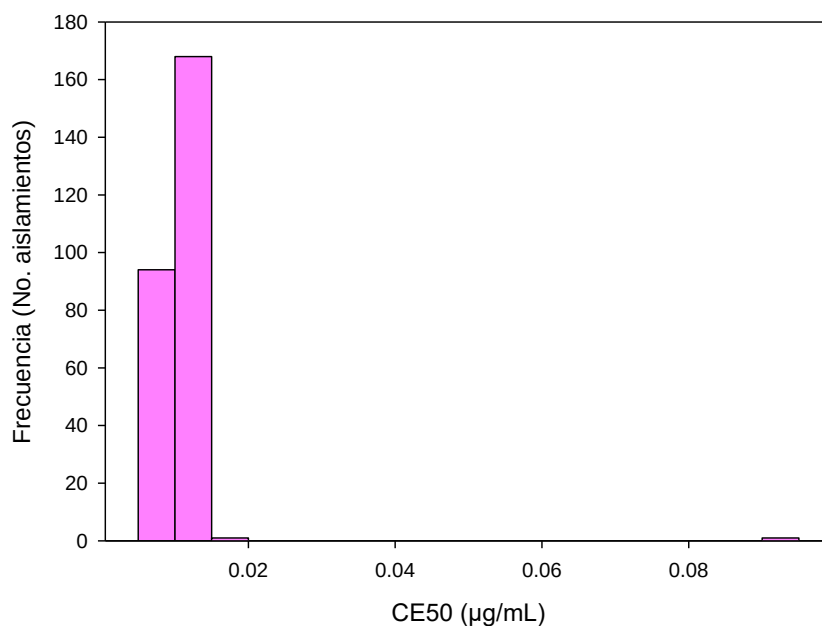


Figura 5. Valores de la EC_{50} del fungicida difenoconazol para los aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.

3.3 Categorización de la respuesta a fungicidas

El grado de sensibilidad y resistencia de los fungicidas, previamente determinados en el Cuadro 5, se categorizaron los aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. según su sensibilidad a los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol. De esta manera, se identifican los aislamientos que eran sensibles, medianamente sensibles, tolerantes o resistentes a cada uno de los fungicidas, lo que se reflejó en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Aislados de *Neopestalotiopsis* spp. sensibles, medianamente resistentes y resistentes a los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol

Aislado	Origen	Azoxystrobin ^a	Boscalid ^b	Difenoconazol ^c
5	Zamora, Mich.	S	MR	S
22	Zamora, Mich.	S	MR	S
66	Tarandacuao, Gto.	MR	R	S
70	Tzirtzicuario, Mich.	S	MR	S
71	Tzirtzicuario, Mich.	MR	R	S
80	Zinapécuaro, Mich.	MR	R	S
87	Zinapécuaro, Mich.	MR	R	S
97	Pátzcuaro, Mich.	MR	R	S
136	Maravatío, Mich.	MR	R	S
196	Abasolo, Gto.	MR	R	S
201	León, Gto.	MR	R	S
323	Maravatío, Mich.	R	R	S
372	Zamora, Mich.	MR	R	S
418	Tangancícuaro, Mich.	R	R	S
466	Dolores Hidalgo, Gto.	R	R	S

S= sensible, MR= medianamente resistente y R=resistente,

^aS a azoxystrobin < 1 µg mL⁻¹; MR a azoxystrobin 1 a 10 µg mL⁻¹; R a azoxystrobin > 10 µg mL⁻¹

^bS a boscalid <10 µg mL⁻¹; MR a boscalid 10 a 50 µg mL⁻¹; R a boscalid > 50 µg mL⁻¹.

^cS a difenoconazol < 0.01; MR a difenoconazol 0.01 a 1 µg mL⁻¹; R a difenoconazol > 1 µg mL⁻¹.

3.4 Identificación molecular y análisis filogenético de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp.

Luego de llevar a cabo la prueba de sensibilidad y la selección de aquellos aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. que cumplieron los parámetros bajo la sensibilidad a los fungicidas (Cuadro 14). Los aislamientos seleccionados crecidos en V8 clarificado (Figura 6).

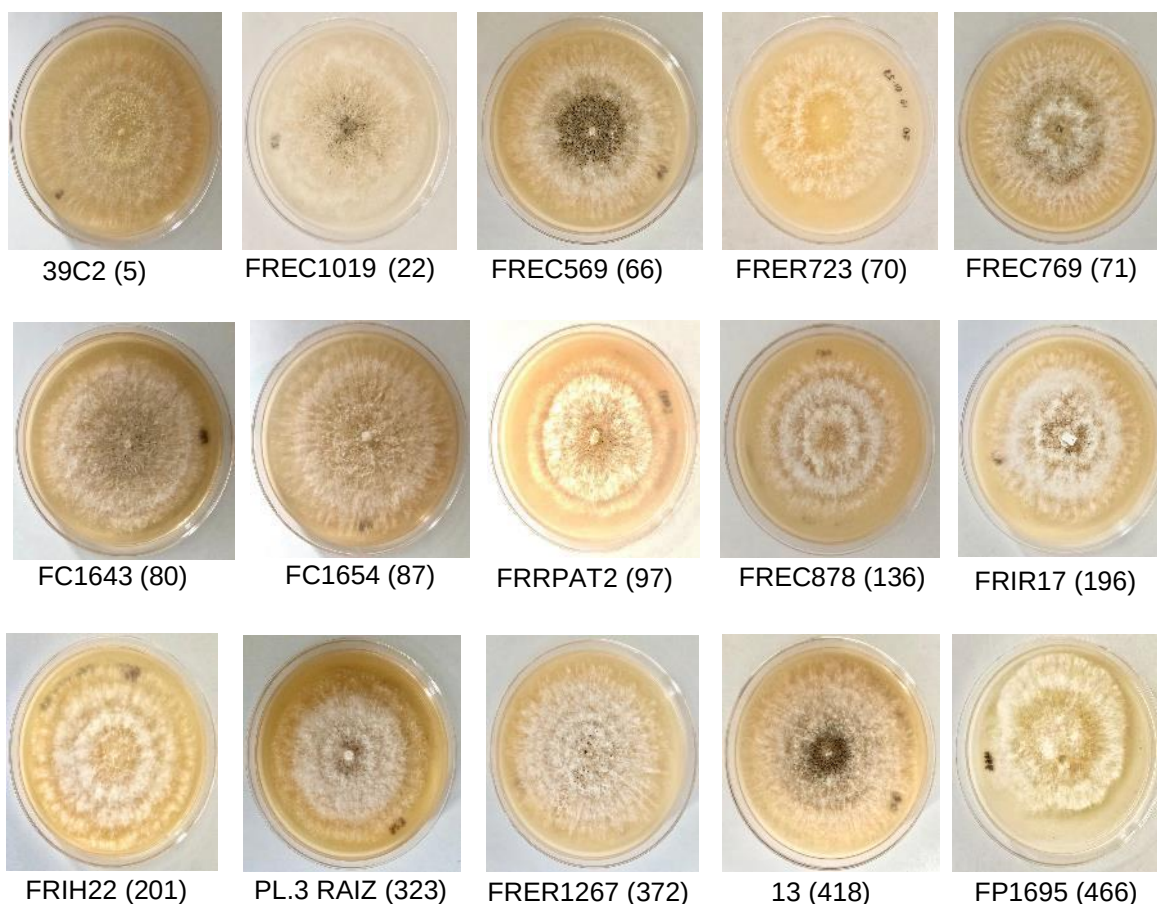


Figura 6. Aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. seleccionados para la identificación molecular y pruebas de patogenicidad en hojas de fresa vs fungicidas.

En el análisis multilocus de las regiones *tef-1 α* , *tub2*, ITS, *rpb2* y LSU, 14 aislamientos se agruparon en el clado *Neopestalotiopsis*, no se distinguieron entre las especies *N. acrostichi*, *N. rosae* y *N. vaccinii*, lo cual indicó la existencia de especies de *Neopestalotiopsis* en los aislamientos analizados, con algunas especies con alta probabilidad posterior y el aislamiento restante se agrupó en *Pestalotiopsis*, entre las especies *P. australasiae*, *P. trachycarpicola*, *P. Kenya*, *P. oryzae* y *P. rhodomyrtus*. Lo que indica que la región ITS no discriminó entre estas especies (Figura 7).

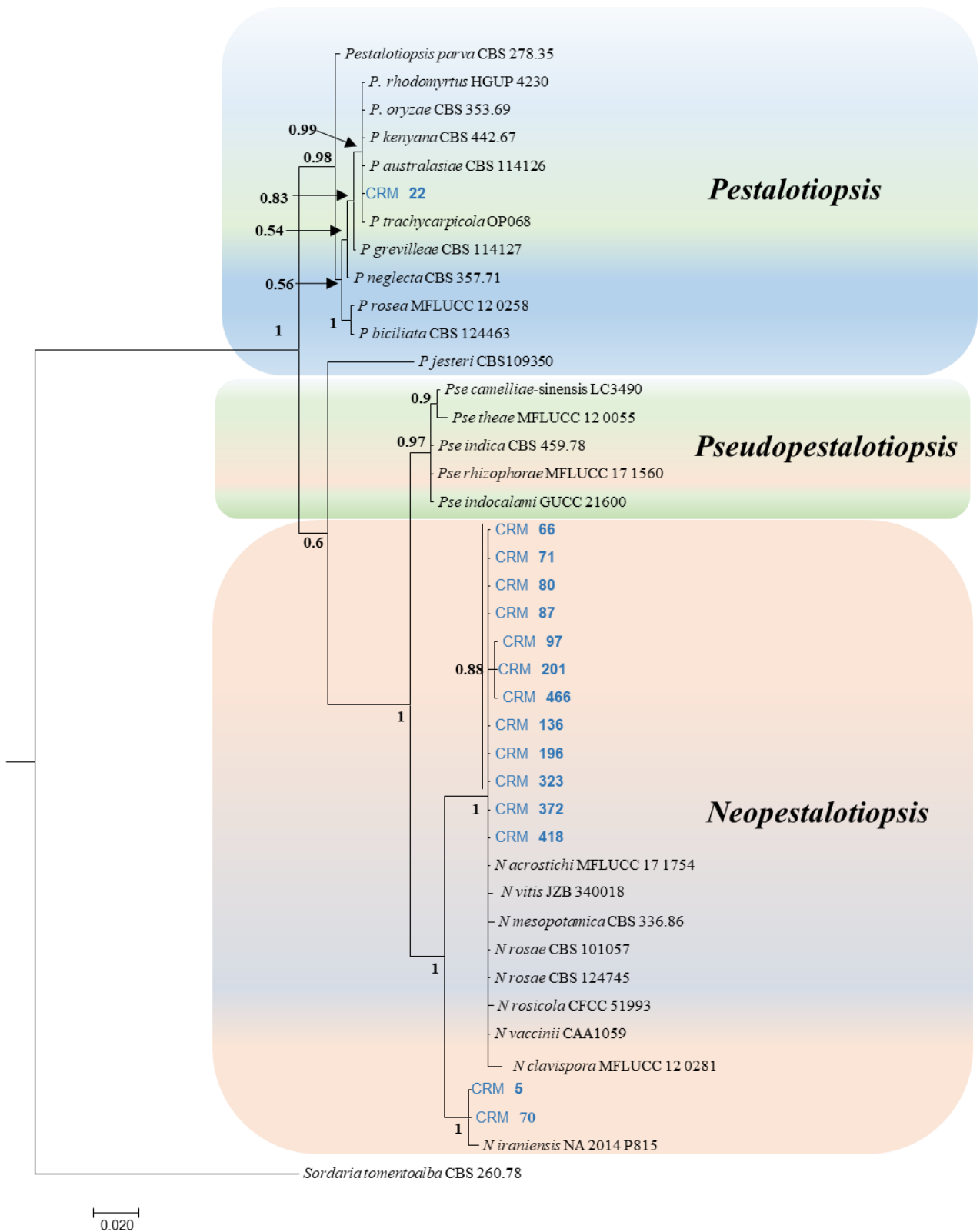


Figura 7: Árbol filogenético bayesiano de la región ITS, con especies de los géneros *Pestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis*. Los números en los nodos corresponden a los valores de probabilidades posteriores (PP). Las cepas en estudio están representadas en azul.

Al realizar el análisis multilocus de los genes *tef-1 α* , *tub2*, ITS, *rpb2* y LSU, se observaron diferencias entre especies de *Neopestalotiopsis*, en los aislamientos generados en este estudio se agruparon 12 aislados con *N. rosae* CBS 101057 con soporte de 0.99/66 con (PP) y bootstrap (BS). Y el aislado 22 en *Pestalotiopsis*, una especie no determinada. Los aislados 5 y 70 se agruparon en *Neopestalotiopsis* con soporte de 1/100 PP/BS (Figura 8).

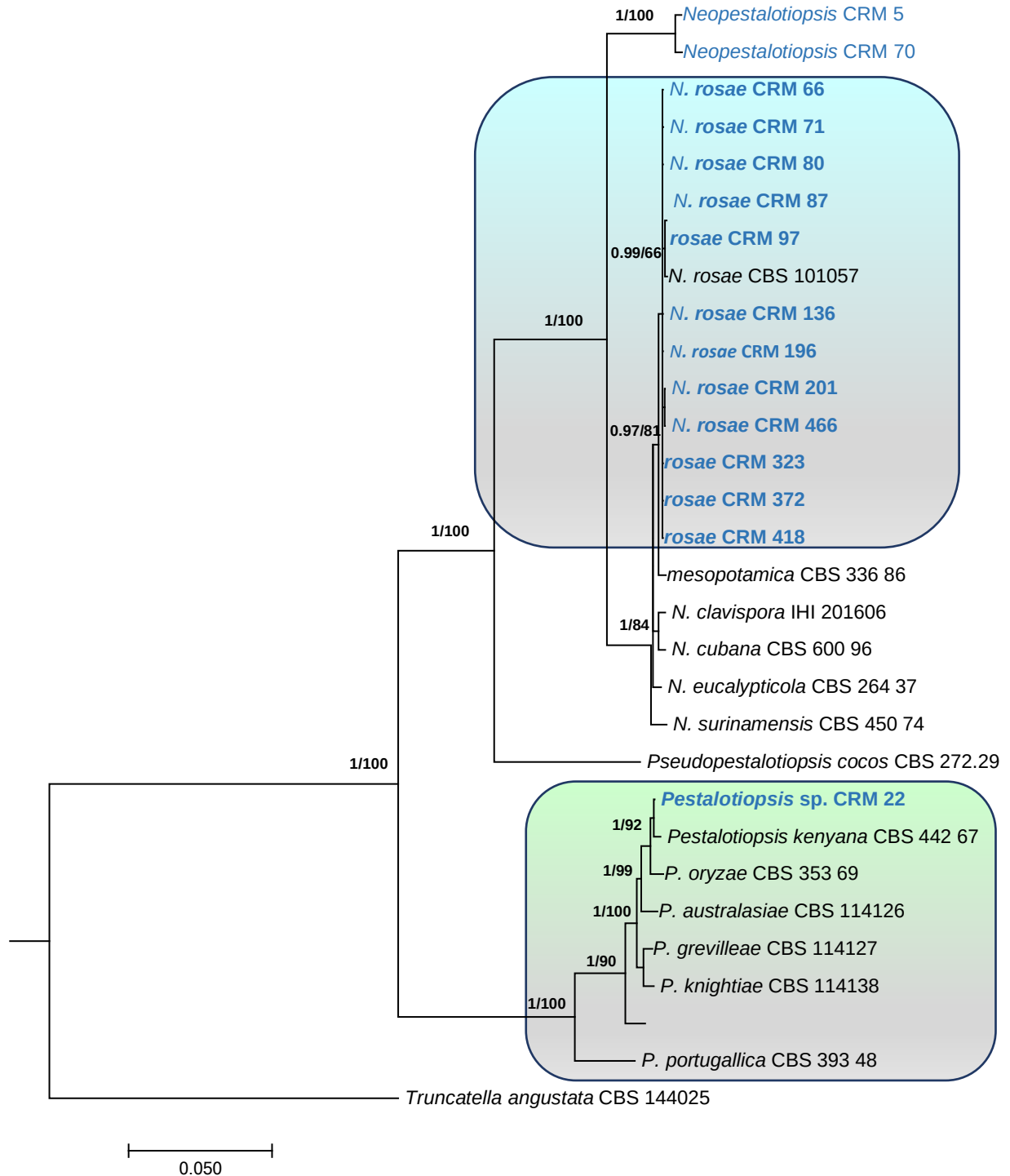


Figura 8: Árbol filogenético bayesiano construido con secuencias concatenadas de la región ITS: espaciadores transcritos internos, gen 5.8S; **LSU**: subunidad larga 28S de rDNA; **rpb2**: segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II dirigida por DNA; **tef-1 α** : factor de elongación de traducción 1-alpha y **tub2**: gen parcial de β -tubulina. Las cepas en letras azules representan especies de *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* identificaron 12 aislados de *N. rosae* y un aislado de *Pestalotiopsis* sp. Se utilizó la secuencia de *Truncatella angustata* CBS 144025 como grupo externo. La barra de escala indica las sustituciones esperadas por sitio.

Dos aislados de *Neopestalotiopsis* con número de identificación 5 y 70 en el análisis multilocus con cinco genes no se agruparon a una especie, pero en el análisis de la región espaciadora transcrita interna (ITS), estas se agrupan con *N. iranensis* P815, por lo que se realizó un análisis multilocus con genes ITS, *tef-1 α* y *tub2* con los cuales esta identificada esta especie (Ayoubi & Soleimani, 2016b) (Figura 9). Los aislados 5 y 70 generados en este estudio se agruparon con *N. iranensis* P815 con soporte de 1/100 (PP/BS).

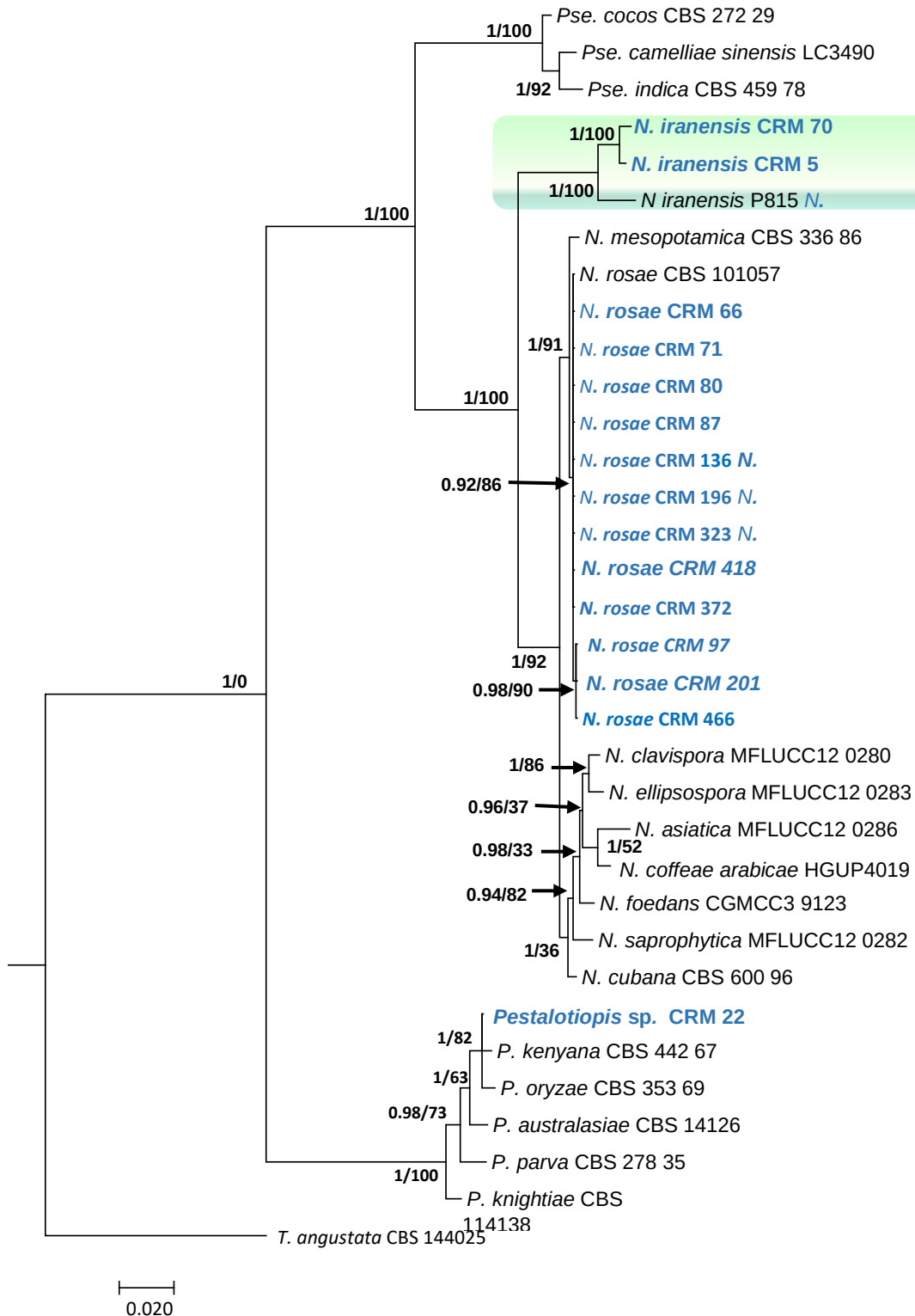


Figura 9. Árbol filogenético bayesiano construido con secuencias concatenadas con la región ITS: ITS: espaciadores transcritos internos, gen 5.8S; *tef-1α*: factor de elongación de traducción 1-alpha y *tub2*: gen parcial de β-tubulina. Los aislados en letras azules representan especies de

Neopestalotiopsis y *Pestalotiopsis*, se identificó dos aislados de *N. iranensis*. Se utilizó la secuencia de *Truncatella angustana* CBS 144025 como grupo externo. La barra de escala indica las sustituciones esperadas por sitio.

Se realizó el índice de homoplasia de los aislados 5 y 70 para corroborar su relación con *N. iranensis* P815, previamente identificada mediante análisis filogenético. El índice de homoplasia se utilizó para evaluar la similitud de la secuencia de ADN entre los aislados y determinar si pertenecen a la misma especie. Los resultados del índice de homoplasia se encontraron 82 sitios informativos y mostraron que los aislados 70 y 5 tienen una alta similitud con *N. iranensis* P815. La prueba phi es estadísticamente significativa ($P = 1.922E-6$).

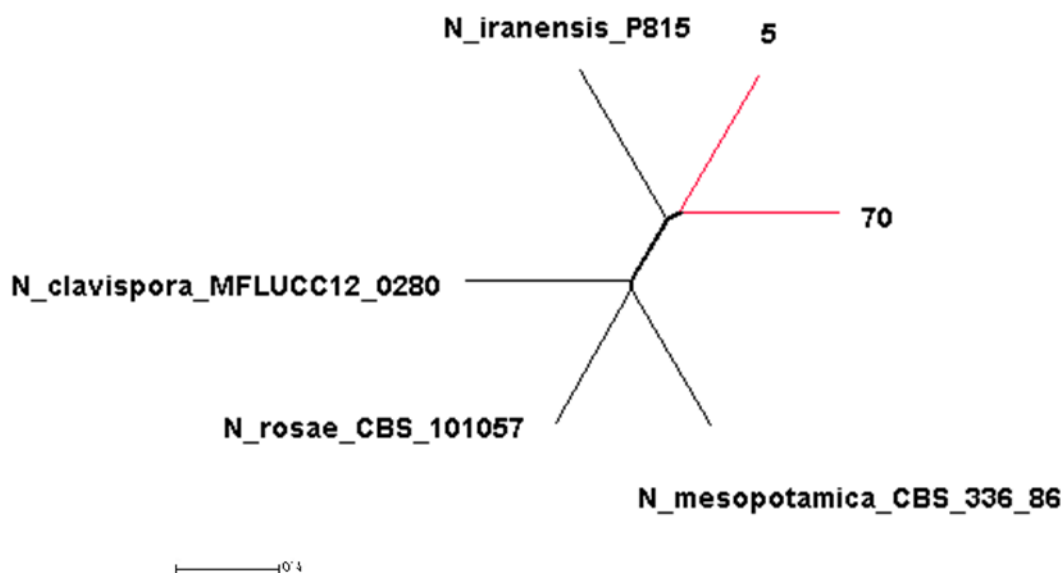


Figura 10. Índice de homoplasia de los aislados 5 y 70 con la especie *N. iranensis* indican no evidencia de recombinación ($P = 1.922E-6$).

3.4.1 Análisis de mutaciones puntuales

Los aislados identificados como *N. rosae* secuenciados con los primers de los genes citocromo b (*cytb*) y tubulina (*tub2*), genes están involucrados en la resistencia de los fungicidas azoxystrobin y metil-tiofanato respectivamente en diversos hongos

fitopatógenos. La amplificación de los aislamientos se pudo obtener suficiente cantidad de material genético para su posterior análisis. De esta manera, se identificó la presencia de mutaciones puntuales en los genes *cyt b* y *tub2*.

3.4.1.1 Mutación en gen *cyt b*

En relación con el gen *cyt b* en los 12 aislamientos identificados como *N. rosae*, se detectó en el codón 143 un cambio de glicina por alanina (G143A) por 11 aislados excepto por el 201 (Figura 11). Estos resultados confirmaron la resistencia observada en las pruebas de sensibilidad, con una EC₅₀ de 10.004 µg/mL y la patogenicidad en hojas desprendidas, siendo los aislamientos medianamente resistentes y resistentes de los seleccionados. Las mutaciones F129L (fenilalanina por leucina), G137R (glicina por arginina) y I151L (isoleucina por leucina) no se detectaron en esta muestra de aislamientos.

3.4.1.2 Mutación en gen *tub2*

En el caso específico de los aislamientos de *N. rosae* mencionados, se detectó la mutación F200Y en los aislamientos 201 (FRIH22) y 97 (FRRPAT2), pero no se observó la mutación E198K en estos aislamientos; en cambio, los aislamientos 66 (FREC569), 71 (FREC769), 80 (FC1643), 136 (FREC878), 196 (FRIR17), 323 (PL.3 RAIZ), 372 (FRER1267) y 418 (13) si expresaron la mutación E198K, que involucra un cambio de adenina a guanina y sustituyó el ácido glutámico por lisina en la posición 198 de la proteína β -tubulina (Figura 12).

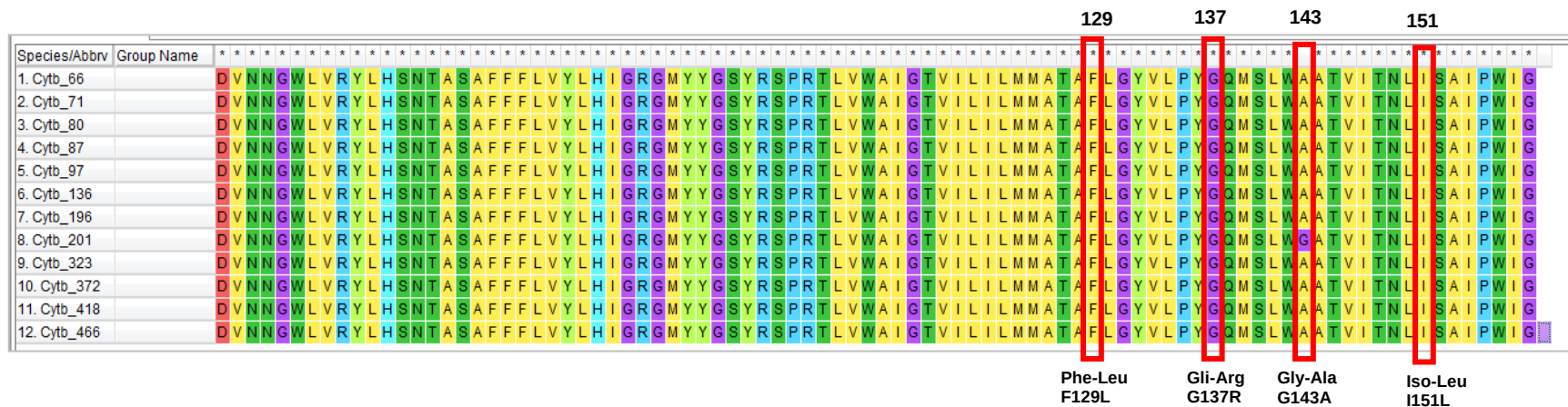


Figura 11. Mutación G143A presente en aislados de *Neopestalotiopsis rosae*. Las mutaciones F129L, G137R y I151L no se detectaron en los aislados de *N. rosae* considerados en este estudio.

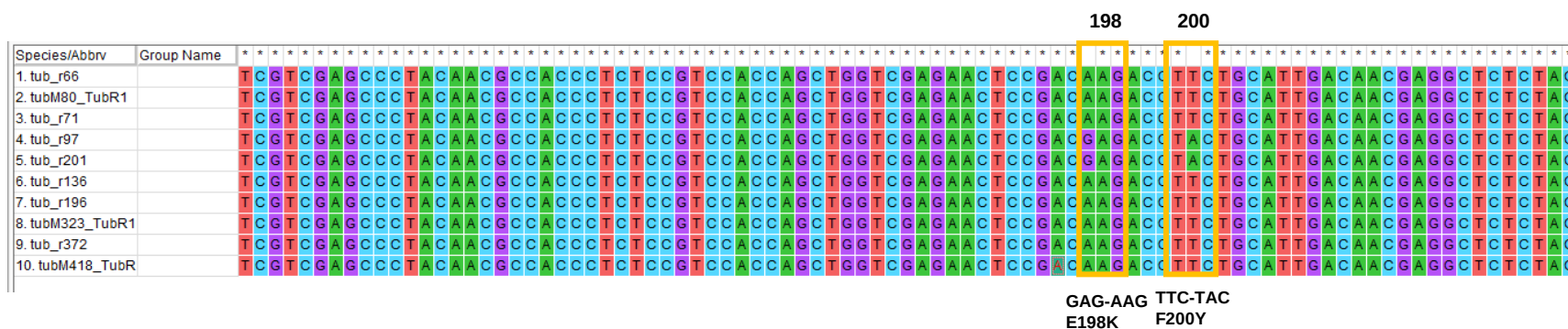


Figura 12. Mutaciones E198K (ácido glutámico a lisina) y F200Y (Fenilalanina a tirosina) asociados al metil-tiofanato, presentes en aislamientos *N. rosae*.

3.5 Influencia del nivel de resistencia a fungicidas en la patogenicidad *Neopestalotiopsis* spp. en hojas desprendidas

Los resultados indicaron que hubo una diferencia significativa en la interacción aislado-fungicida ($P < 0.0001$, $F = 2.60$). Cuando se expusieron los aislamientos a azoxystrobin, se observó que el aislamiento 196 (FRIC 17) no mostró una diferencia significativa en comparación con el 418 (13) ($P < 0.0001$, $F = 10.59$), ya que ambos demostraron alta virulencia, seguidos los aislamientos 201 y 323. En particular, los aislamientos 196 y 418 alcanzaron aproximadamente un 70% de severidad en las hojas de fresa desprendidas. En contraste, se encontró que el aislado 5 (39C2) fue la menos patogénica, ya que presentó una severidad del 0.461% después de un periodo de incubación de 8 d, siendo el aislamiento más susceptible en esta prueba. Además, no se observó una diferencia significativa en la interacción aislado-fungicida ($P = 0.9429$, $t = 0.07$) para este aislado (Figura 13).

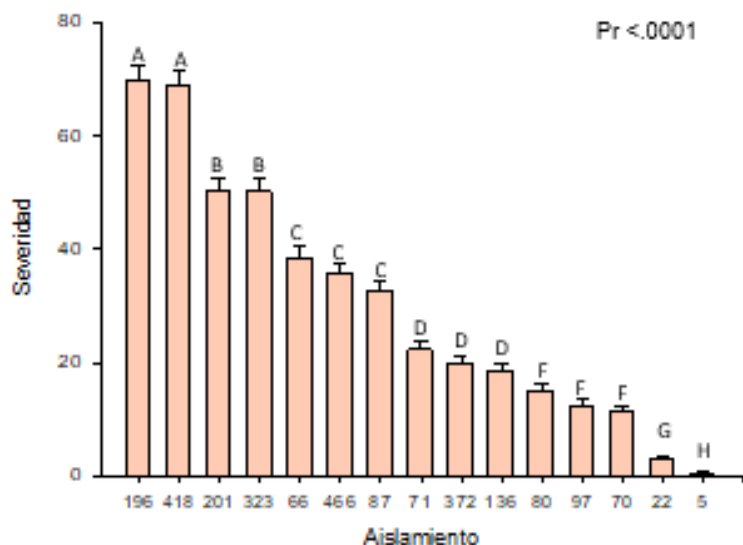


Figura 13. Comparación de la severidad causadas por los aislamientos de *Neopestalotiopsis rosae*, *N. iranensis* y *Pestalotiopsis* sp. en hojas de fresa tratadas con azoxystrobin.

También con boscalid el aislado 196 (*N. rosae*) mostró la mayor patogenicidad en comparación con el resto de los aislamientos evaluados, pero no diferencia significativa con el aislamiento 201, causando un 70% de severidad en las hojas de

fresa. Los aislados 323, 418 y 466 presentaron un poco más del 50% de severidad, lo cual puede estar asociado con la resistencia al fungicida que presentaron dichos aislados. Por otro lado, el aislamiento 5 se mantuvo mostrando susceptibilidad también al Boscalid, con una severidad del 0.8% (Figura 14).

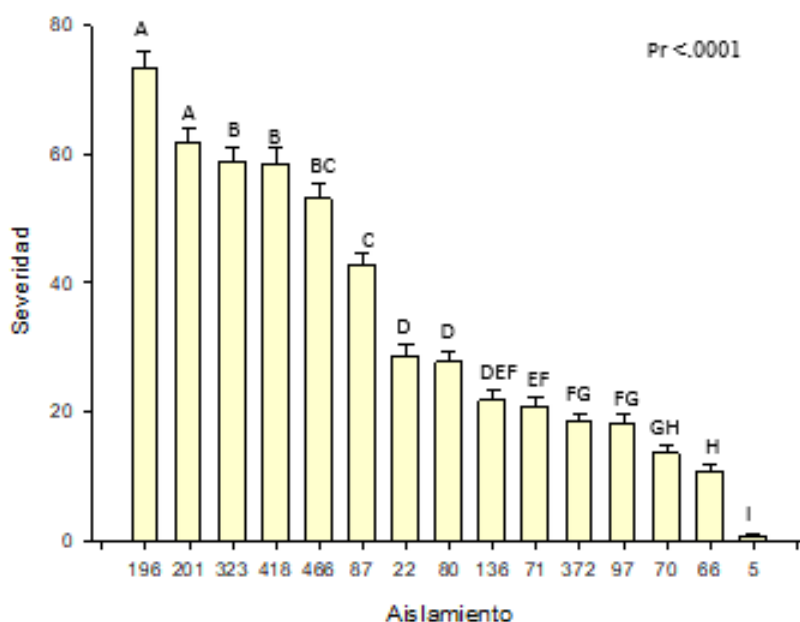


Figura 14. Comparación de la severidad causada por los aislamientos de *Neopestalotiopsis rosae*, *N. iranensis* y *Pestalotiopsis* sp. en hojas de fresa tratadas con boscalid

Los aislamientos de *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* mostraron susceptibilidad al difenoconazol en comparación con el testigo inoculado en hojas de fresa. Específicamente, los aislamientos 87 y 196 de *Neopestalotiopsis* presentaron una severidad aproximadamente del 20%, y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 15). Por otro lado, los aislamientos 70 y 5 identificados como *N. iranensis* fueron los más susceptibles y siendo estadísticamente iguales ($Pr = 0.8639$, $t = 1.000$), causando una severidad de 0.189%.

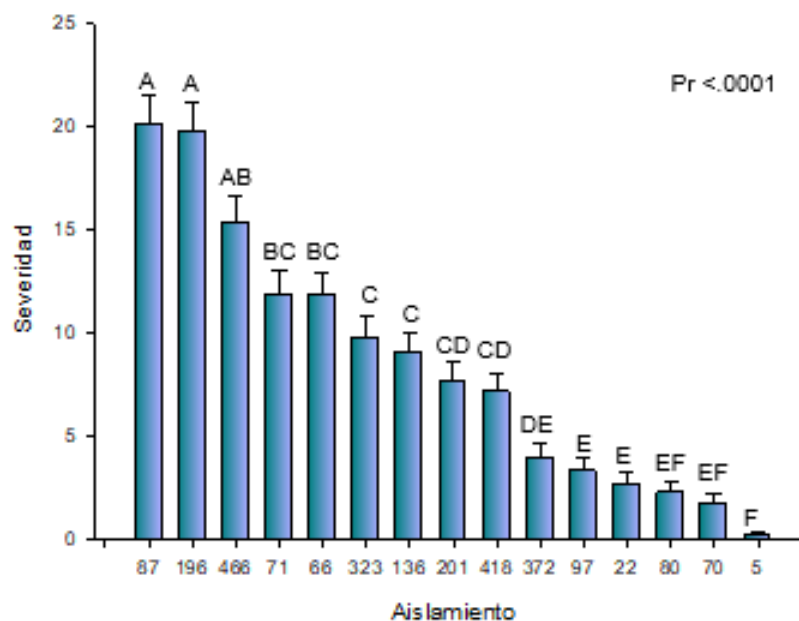


Figura 15. Comparación de la severidad causada por los aislamientos de *Neopestalotiopsis rosae*, *N. iranensis* y *Pestalotiopsis* sp. en hojas de fresa tratadas con difenoconazol.

En el caso del fungicida metil-tiofanato, los aislamientos 323 y 196 presentaron una severidad cercana al 80% superior al control (testigo inoculado), no presentaron diferencia estadísticamente entre ellos, mientras que el aislamiento 5 mostró una severidad del 0.76% (Figura 16), es un aislamiento sensible a los cuatro fungicidas, ya que mostró menor severidad en las hojas de fresa.

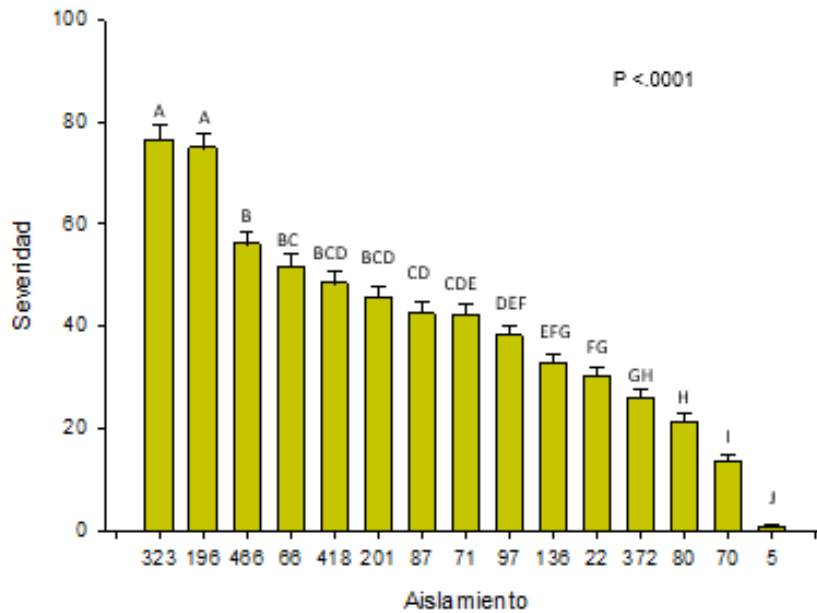


Figura 16. Comparación de la severidad causada por los aislamientos de *Neopestalotiopsis rosae*, *N. iranensis* y *Pestalotiopsis* sp. en hojas de fresa tratadas con metil-tiofanato.

Finalmente, los testigos inoculados con cada uno de los aislamientos, se observó que los aislamientos 196, 418, 466, 323 y 201 (identificados como *N. rosae*) presentaron una mayor patogenicidad con porcentajes de severidad superiores al 50% y resistencia en las pruebas de sensibilidad. Por otro lado, el aislamiento 5 continuó mostrando una patogenicidad menor en comparación del resto de la muestra de aislados (Figura 17).

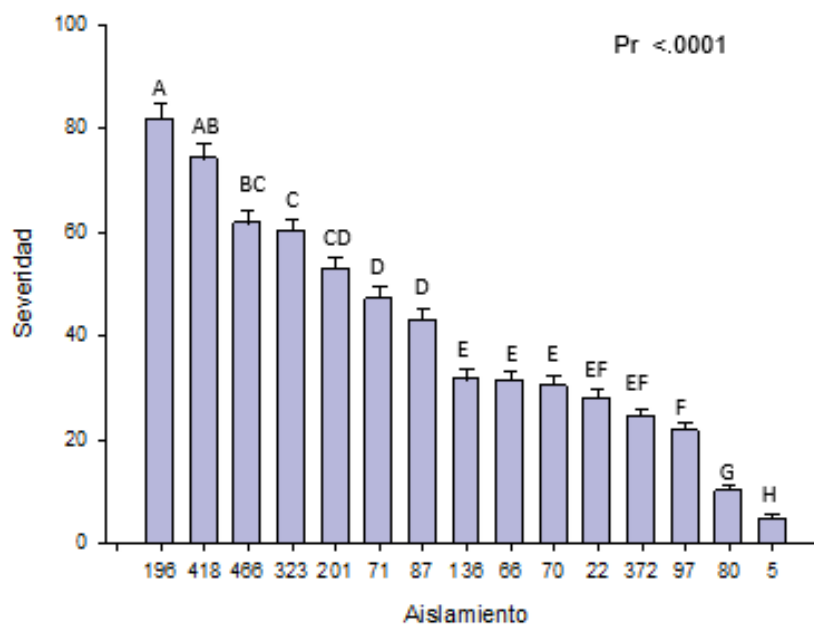


Figura 17. Comparación de la severidad causada por aislamientos de *Neopestalotiopsis rosae*, *N. iranensis* y *Pestalotiopsis* sp. en hojas de fresa

Durante la prueba de patogenicidad, se observó en las hojas de fresa tratadas con los fungicidas azoxystrobin, boscalid y metil-tiofanato se presentó un porcentaje de severidad igual o mayor que en el control. Específicamente, se presentó una mayor severidad por los aislamientos 196, 323, 418, 466 y 201 en las hojas tratadas con metil-tiofanato en comparación con el control.

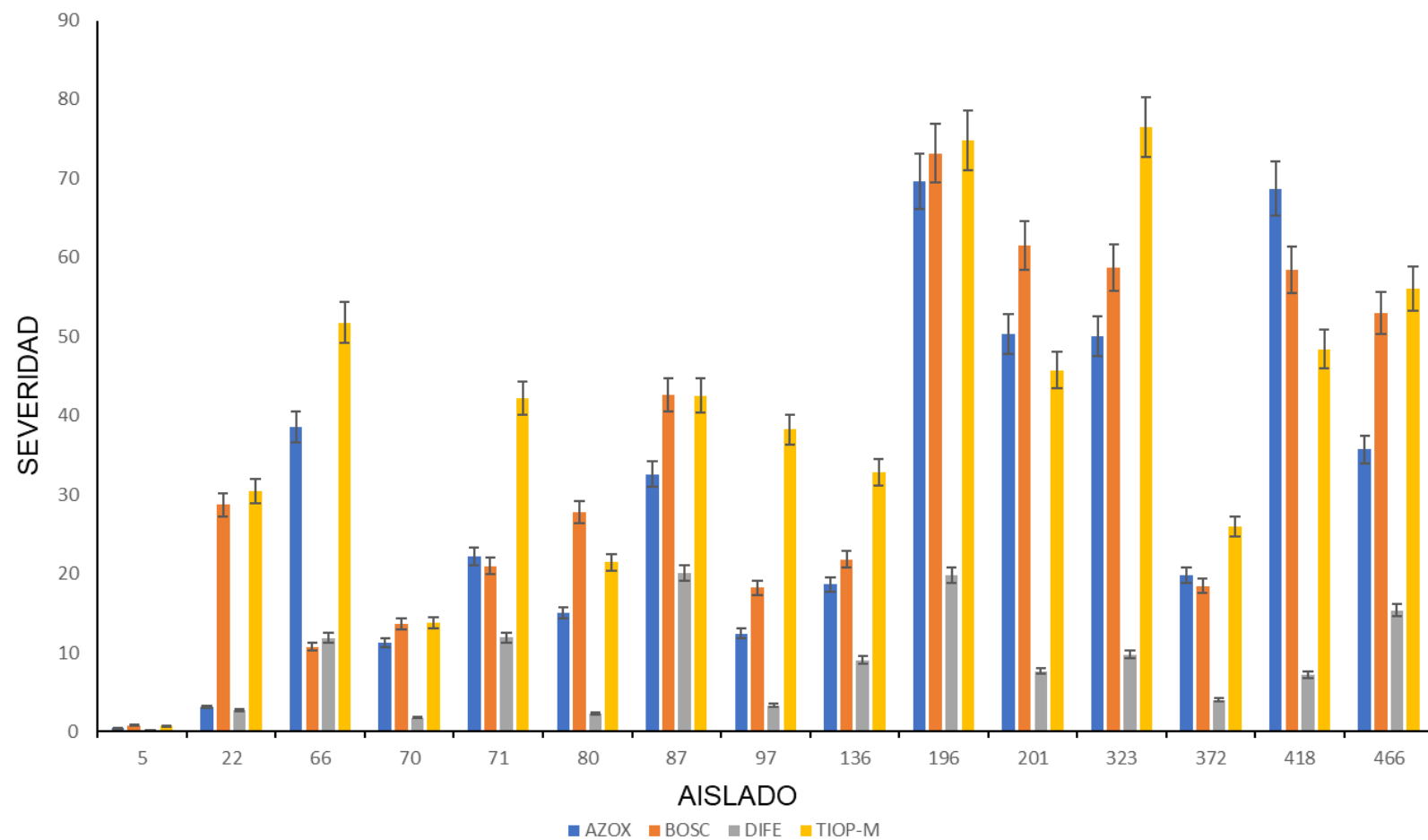


Figura 18: Severidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp. y *Pestalotiopsis* sp. expuestos a azoxistrobin, boscalid, difenoconazol y metil-tiofanato.

Los aislamientos que presentaron resistencia a los fungicidas en la prueba de sensibilidad *in vitro* y la prueba de patogenicidad son provenientes de corona (196), raíz (323) y hoja (201, 418) y peciolo (466) de fresa. Y los aislamientos que se presentaron como sensibles, fueron aislados de corona (5, 22) y raíz (70) de fresa (Cuadro 15). La correlación del fungicida azoxystrobin entre la severidad y CE_{50} es fuerte y positiva ($C = 0.853$), es decir hubo una asociación entre los valores de severidad y su sensibilidad, en este fungicida, sugiriendo que la resistencia al fungicida no afecta su capacidad de causar enfermedad. En Boscalid la correlación fue de $C = 0.714$, y en difenoconazol la correlación es débil y no significativa ($C = 0.336$), por lo que la sensibilidad no influyó en la severidad en este fungicida.

Cuadro 15. Período de incubación, categorías de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. con relación a la prueba de sensibilidad y patogenicidad y el origen del aislamiento.

FUNGICIDA	AISLADO	PERIODO DE INCUBACIÓN	SEVERIDAD MEDIA	EC_{50}	ORGANO	CATEGORÍA ¹
AZOX	5	48	0.47	0.45	Corona	S
AZOX	22	48	3.10	0.50	Corona	S
AZOX	66	48	38.52	8.96	Corona	MR
AZOX	70	48	11.25	0.47	Raíz	S
AZOX	71	48	22.20	7.66	Corona	MR
AZOX	80	24	15.03	8.78	Corona	MR
AZOX	87	24	32.57	8.15	Corona	MR
AZOX	97	24	12.39	8.16	Raíz	MR
AZOX	136	24	18.64	6.96	Corona	MR
AZOX	196	24	69.66	8.90	Corona	MR
AZOX	201	24	50.34	11.21	Hoja	MR
AZOX	323	24	50.07	12.80	Raíz	R
AZOX	372	24	19.76	9.14	Raíz	MR
AZOX	418	24	68.68	14.10	Hoja	R
AZOX	466	24	35.68	11.37	Peciolo	R
BOSC	5	96	0.81	26.28	Corona	MR
BOSC	22	48	28.69	26.41	Corona	MR
BOSC	66	48	10.74	67.14	Corona	R
BOSC	70	24	13.58	17.98	Raíz	MR
BOSC	71	48	20.92	88.13	Corona	R
BOSC	80	24	27.80	99.88	Corona	R
BOSC	87	24	42.61	101.91	Corona	R
BOSC	97	24	18.25	104.37	Raíz	R
BOSC	136	24	21.81	101.61	Corona	R
BOSC	196	24	73.18	114.61	Corona	R

FUNGICIDA	AISLADO	PERIODO DE INCUBACIÓN	SEVERIDAD MEDIA	EC ₅₀	ORGANO	CATEGORÍA ¹
BOSC	201	24	61.52	111.23	Hoja	R
BOSC	323	24	58.69	103.24	Raíz	R
BOSC	372	24	18.44	87.78	Raíz	R
BOSC	418	24	58.48	100.15	Hoja	R
BOSC	466	24	53.00	113.17	Pecíolo	R
DIFE	5	72	0.19	0.008	Corona	S
DIFE	22	48	2.72	0.009	Corona	S
DIFE	66	48	11.85	0.008	Corona	S
DIFE	70	48	1.79	0.009	Raíz	S
DIFE	71	48	11.89	0.009	Corona	S
DIFE	80	48	2.28	0.010	Corona	S
DIFE	87	24	20.09	0.011	Corona	S
DIFE	97	24	3.33	0.009	Raíz	S
DIFE	136	24	9.08	0.010	Corona	S
DIFE	196	24	19.74	0.011	Corona	S
DIFE	201	24	7.67	0.009	Hoja	S
DIFE	323	24	9.78	0.011	Raíz	S
DIFE	372	24	4.00	0.009	Raíz	S
DIFE	418	24	7.19	0.011	Hoja	S
DIFE	466	24	15.35	0.009	Pecíolo	S

¹S=Sensible, MS= Medianamente Resistentes y R=Resistente

4. DISCUSIÓN

En este estudio se determinó la distribución de la sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis* spp., asociados al tizón foliar y pudrición de corona de la fresa. La CE_{50} media de azoxystrobin a 10 $\mu\text{g/mL}$, boscalid 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y difenoconazol 0.010971 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados evidenciaron una amplia distribución de la sensibilidad de dichos aislados al fungicida azoxystrobin. En el presente estudio, en las pruebas de sensibilidad se observó que algunos aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. presentaron una disminución de la sensibilidad y un cambio hacia la resistencia al fungicida azoxystrobin (Chung et al., 2021) y al boscalid, los resultados similares a los reportados por Baggio et al. en 2022. Posterior a la determinación de la CE_{50} y la categorización de aislamientos sensibles, medianamente resistentes y resistentes en los tres fungicidas evaluados, esto en base a rangos de concentraciones efectivas, como en estudios realizados en azoxystrobin con *Sclerotinia sclerotiorum*, se determinó a $< 0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para aislados sensibles y $\geq 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para aislados resistentes (Nieto-López et al., 2023), en *Phytophthora infestans* un rango de 0.042 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para aislados sensibles y 0.26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en el aislado menos sensible (Qin et al., 2016). Del mismo modo, para difenoconazol frente a *Alternaria* spp. van desde $<1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para aislados sensibles a $>1 \mu\text{g mL}^{-1}$ para aislados resistentes (Lacomis-Vasilescu et al., 2004). Aislados de *Botrytis cinerea* sensibles a boscalid oscilan a CE_{50} entre 0.9 y 5.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que los aislados resistentes $>50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Bardas et al., 2010). Mientras que en estudios realizado por Veloukas et al. (2011), aislamientos sensibles 0.05 a 0.21 $\mu\text{g/mL}$, moderadamente resistentes EC_{50} de 1.37 a 7.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y resistentes la $CE >50 \mu\text{g mL}^{-1}$ a boscalid. En aislados de *Pestalotiopsis longiseta* y *Pestalotiopsis theae* en Corea fueron resistentes a metil-tiofanato a CE_{50} 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Shin et al., 2000). Además, investigaciones en fungicidas benzimidazoles sobre *Pestalotiopsis* spp. (sarna del guayabo) en Taiwán, mostraron baja sensibilidad al benomilo y carbendazim con valores de la EC_{50} que fueron superiores a 53.6 mg i. a. L^{-1} y 500 mg i. a. L^{-1} , respectivamente (Yong et al., 2014). De igual manera se evaluaron las

características morfológicas y moleculares, la patogenicidad y la sensibilidad a fungicidas en *Pestalotiopsis* spp. en Florida (Baggio et al., 2019).

Estos resultados son importantes para evitar un manejo inadecuado y el registro de fungicidas que generen resistencia a enfermedades de la fresa. Por otro lado, se determinó que el difenoconazol fue uno de los fungicidas más eficaces para reducir el crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis* spp., tanto en campos de fresa como en pruebas *in vitro* (Rebollar-Alviter et al., 2020), Cosseboom & Hu (2021) mencionan en cultivos de uva el uso de difenoconazol para el manejo de *N. rosae*, por su sensibilidad a este fungicida. Lo que se confirmó en este estudio, la alta sensibilidad de *Neopestalotiopsis* spp. al difenoconazol.

Neopestalotiopsis rosae es un hongo que se ha identificado en diferentes partes del mundo (Essa et al., 2018; Baggio et al. 2020; Rebollar-Alviter et al., 2020; Sun et al., 2021; Wu et al., 2021), causando daños en el cultivo de fresa. En base al análisis filogenético con las regiones *tef-1 α* , ITS y *tub2* por Maharachchikumbura et al. (2014), para clasificación de *N. rosae*. El presente estudio con el análisis multilocus de 5 regiones (*tef-1 α* , ITS, *tub2*, LSU y *rpb2*) con soporte de 0.99/66 PP/BS para los aislados agrupados con *N. rosae*, coincide con Rebollar-Alviter et al. (2020), donde *N. rosae* se agrupó al Ex-tipo CBS 101057 con soporte de 0.61/91 PP/BS y Essa et al. (2018) reportan una similitud de 99/100 PP/BS.

Y el análisis filogenético de las regiones ITS, *tef-1 α* y *tub2* de los aislamientos 5 y 70 en estudio se identificaron con un soporte de 1/100 (PP/BS) con la especie *N. iranensis* P815 (Ayoubi & Soleimani, 2016b) y un índice de homoplasia de 1.922E-6. Además, estos aislamientos mostraron una mayor sensibilidad y menor patogenicidad a los fungicidas azoxystrobin, boscalid y difenoconazol en comparación con los aislados de *N. rosae*. En resultados obtenidos por Ayoubi & Soleimani (2016b), reportaron que *N. iranensis* tardó más tiempo en desarrollar síntomas en comparación con la especie *N. mesopotamica*. Resultados similares fueron obtenidos en este estudio en comparación con los aislados de *N. rosae*.

En los aislamientos de *N. rosae* se detectó la mutación G143A, la cual proporciona resistencia al azoxystrobin, excepto en el aislado 201. Estos aislados, además mostraron mayor severidad en las pruebas realizadas en hojas desprendidas, corroborando la falta de eficacia cuando se aplicó el fungicida a la dosis comercial. También se corroboró las mutaciones E198K en los aislados 201 y 97, F200Y en 66, 71, 80, 136, 196, 323, 372 y 418 causadas por el metil-tiofanato. En hongos como *Colletotrichum acutatum* agente causal de la antraxosis en fresa el uso desmedido del azoxystrobin ha llevado a la selección de poblaciones resistentes de *C. acutatum* a los fungicidas Qol y *Botrytis cinerea* de igual forma ha presentado una resistencia a los Qol; específicamente al azoxystrobin con la presencia de la mutación G143A y para tiofanato de metil la mutación E198A (Baggio et al., 2018b; Fernández-Ortuño et al., 2012; Forcelini et al., 2016). Yamada and Sonoda (2012) determinaron la resistencia por *Pestalotiopsis longiseta* a fungicidas inhibidores de quinona (Qol) con la presencia de la mutación G143A. Luego, Yamada et al. (2016), detectaron en aislados de *Pestalotiopsis longiseta* de plantaciones de té, la sustitución de glicina por alanina en la posición 143 (G143A) y fenilalanina por leucina en 129 (F129L). Yong et al. (2014), al determinar la resistencia mediante la CE_{50} de *Pestalotiopsis* spp., determinó la mutación puntual E198A. Además, Baggio et al. (2022) evidenció la presencia de la mutación G143A en aislamientos resistentes de *Neopestalotiopsis rosae* en Florida.

En la prueba de patogenicidad, se encontró que los aislamientos resistentes 196, 323, 418, 466 y 201 presentaron una mayor virulencia en las hojas de fresa, causando un mayor porcentaje de severidad con azoxystrobin, boscalid y metil-tiofanato. Y los aislamientos 5, 70 y 22 sensibles al azoxystrobin, boscalid, difenoconazol y metil-tiofanato, presentaron un porcentaje de severidad menor del control.

La correlación la CE_{50} , los aislados sometidos al azoxystrobin con la severidad fue fuerte y positiva ($C = 0.853$), similar a lo que ocurrió con el Boscalid la correlación

también es estadísticamente significativa ($C = 0.714$), mientras que en difenoconazol la es débil y no significativa ($C = 0.336$), por lo que la sensibilidad no influyó en la severidad en este fungicida.

En resumen, es estudio evidencia por primera vez, que la población de *Neopestalotiopsis* spp. asociada a tizones foliares y pudrición de la fresa, en general manifiesta un nivel medio a alto de resistencia al azoxystrobin y al boscalid, pero es susceptible al difenoconazol, lo que podría ocurrir con otros triazoles y otros ingredientes activos de las mismas familias. Asimismo, los resultados evidenciaron que la población de *Neopestalotiopsis* spp. está compuesto por más de una especie lo que evidenció diferencias en la patogenicidad en el cultivo de fresa y la respuesta diferencial a fungicidas de diferente modo de acción. Estos resultados sugieren que la presencia de mutaciones en citocromo bc1, resulta en resistencia total o parcial al grupo de los QoI y SDHI (Boscalid), lo que motiva al diseño de programas de manejo de la resistencia a fungicidas de diferente modo de acción. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la patogenicidad e insensibilidad de los aislados de *N. rosae* pueden verse influenciadas por diversos factores, como las condiciones ambientales y la genética del hongo y del hospedero, por lo que es relevante seguir investigando para comprender mejor la dinámica de la enfermedad y el manejo adecuado de este hongo en el cultivo de fresa con el uso de boscalid u otros fungicidas.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, los estudios realizados en la prueba de sensibilidad de aislados de *Neopestalotiopsis rosae*, *N. iranensis* y *Pestalotiopsis* sp. con los fungicidas azoxystrobin, boscalid, difenoconazol, es de gran importancia para el manejo del cultivo de fresa. Ya que los aislamientos expuestos a la prueba de sensibilidad se determinaron que son resistentes al azoxystrobin, boscalid. En el caso de azoxystrobin, la sensibilidad no afecta su capacidad de causar enfermedad a los aislados medianamente resistentes y resistentes de *Neopestalotiopsis* spp. sin la presencia del fungicida. Lo que implica que, si los aislamientos son resistentes, entonces eso no afecta su capacidad de causar enfermedad y por lo tanto se tiene una población resistente o insensible a este grupo de fungicidas.

Los análisis filogenéticos permitieron identificar y clasificar a los aislados en los géneros *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* en función de su relación filogenética con otras especies conocidas de los géneros. Esta información es importante porque muestra la relación evolutiva de los aislados en estudio, lo cual es relevante para la comprensión de su biología, epidemiología y potencial patogénico en cultivos agrícolas o plantas hospedantes. La confirmación de las mutaciones puntuales causadas por los fungicidas azoxystrobin y metil-tiofanato en aislamientos de *N. rosae*, ratificó la resistencia a estos fungicidas. La prueba de patogenicidad de los aislamientos en hojas desprendidas de fresa tratadas con azoxystrobin, boscalid, difenoconazol y metil-tiofanato para comprender la capacidad de *Neopestalotiopsis rosae* de conservar su patogenicidad y al mismo tiempo generar resistencia a los fungicidas, azoxystrobin, boscalid y metil-tiofanato.

6. LITERATURA CITADA

- Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. (2013a). Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease*, 97(3):393–401. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-12-0748-RE>
- Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. (2013b). Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. *Plant Disease*, 98(4):532–539. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0753-RE>
- Amiri, A., Heath, S. M., & Peres, N. A. 2014. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Strawberry. *Plant Disease*, 98:532–539.
- Avenot, H. F., & Michailides, T. J. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. In *Crop Protection*, 29 (7): 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>
- Ayoubi, N., & Soleimani, M. J. (2016). Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. *Current Microbiology*, 72(3):329–336. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0955-y>
- Baggio, J. S., Wang, N. Y., Peres, N. A. & Amorim, L. (2018a). Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from strawberry fields of São Paulo and Espírito Santo States, Brazil, to azoxystrobin, difenoconazole and thiophanate-methyl. *Trop. Plant Path.* 43: 533-542.
- Baggio, J., Peres, N., & Amorim, L. (2018b). Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from conventional and organic strawberry fields in Brazil to azoxystrobin, iprodione, pyrimethanil, and thiophanate-methyl. *Plant disease*. 102:1803-1810. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1221-RE>
- Baggio, J. S., & Peres, N. A. (2020). *Pestalotia* leaf spot and fruit rot of strawberry. *EDIS*, (5). <https://doi.org/10.32473/edis-pp357-2020>
- Baggio, J. S., Suguinoshita Rebello, C., Bolognesi de Moraes, M., Marin, M. V., Gama, A. B., Forcelini, B. B., Mertely, J., & Peres, N. A. (2022). Efficacy of single- and multi-site fungicides against *Neopestalotiopsis* spp. of strawberry. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-22-1929-re>

- Banno, S., F. Fukumori, A. Ichiishi, K. Okada, H. Uekusa, M. Kimura, & M. Fujimura. (2008). Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 98:397–404.
- Barber, P. A., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Pascoe, I. G., & Keane, P. (2011). Reassessing *Vermisporium* (Amphisphaeriaceae), a genus of foliar pathogens of eucalypts. *Persoonia*, 27(1):90–118. <https://doi.org/10.3767/003158511X617381>.
- Bardas, G. A., Veloukas, T., Koutita, O., & Karaoglanidis, G. S. (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*, 66(9):967–973. <https://doi.org/10.1002/ps.1968>
- Biju, C. N., Peeran Peeran, M. F., & Gowri, R. (2018). Identification and characterization of *Neopestalotiopsis clavispora* associated with leaf blight of small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Journal of Phytopathology*. 166:532–546. <https://doi.org/10.1111/jph.12715>
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? In *FRAC Monograph 1, 2nd edition, Brussels: FRAC*.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycology*, 91(3):553–556.
- Cookea, D. E. L., Lees, A. K., Hansen, J. G., Lassen, P., Andersson, B., & Bakonyi, J. (2009). From a European to a global database of *Phytophthora infestans* genetic diversity: Examining the nature and significance of population change. *Acta Horticulturae*, 834. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.834.1>
- Cosseboom, S. D., & Hu, M. (2021). Diversity, pathogenicity, and fungicide sensitivity of fungal species associated with late-season rots of wine grape in the mid-Atlantic united states. *Plant Disease*, 105(10):3101–3110. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0006-RE>
- Darapanit, A., Boonyuen, N., Leesutthiphonchai, W., Nuankaew, S., & Piasai, O. (2021). Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on

Neopestalotiopsis and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases. *Scientific Reports*, 11(1):22606. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02113-5>

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, 224 new heuristics and high-performance computing. *Nat. Methods* 9:772

Dovas, C. (1976). the adaptability of the benomyl-resistant population of *Cercospora beticola* in Northern Greece. *Phytopathology*, 66(12):1452–1456. <https://doi.org/10.1094/phyto-66-1452>

Egüen, B., Melgarejo, P., & de Cal, A. (2016). The effect of fungicide resistance on the structure of *Monilinia laxa* populations in Spanish peach and nectarine orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4):815–827. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0871-4>

Esteriol, M., Copier, Ch., Román, A., Araneda, M. J., Rubilar, M., Pérez, I., & Auger, J. (2017). Frequency of fungicide-resistant *Botrytis cinerea* populations isolated from ‘Thompson Seedless’ table grapes in the Central Valley of Chile. *Cienc. Inv. Agr.*,44(3):294–305.

Essa, T., Kamel, S., Ismail, A., & El-Ganainy, S. (2018). Characterization and Chemical Control of *Neopestalotiopsis rosae* the Causal Agent of Strawberry Root and Crown Rot in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 46(1):1–19. <https://doi.org/10.21608/ejp.2018.87411>

Fernández-Ortuño, D., Chen, F., & Schnabel, G. 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease*, 96:1198-1203.

Forcelini, B. B., Seijo, T. E., Amiri, A., & Peres, N. A. (2016). Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Disease*, 100(10): 2050-2056. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0118-RE>

Förster, H., Kanetis, L., & Adaskaveg, J. E. (2004). Spiral gradient dilution, a rapid method for determining growth responses and 50% effective concentration values in fungus-fungicide interactions. *Phytopathology*, 94 (2):163–170. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.2.163>

- FRAC. (2022). FRAC code list©2022: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). Recuperado de https://www.frac.info/docs/default-source/publications/2022/frac-code-list-2022-final.pdf?sfvrsn=9e02fa3a_2.
- Fraaije, B. A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H. J., Lucas, J. A., & Fraaije, M. W. (2012). Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control *Septoria* leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology*, 13(3): 263-275. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., & McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*, 58(9):859-867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1323–1330.
- González, A. U. (2022). Caracterización de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. y efecto de fungicidas en pre y post-infección en el cultivo de fresa. Tesis. UACH. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/123456789/1443>
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. In *Journal of Chemical Biology*, 7(4):133–141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hall, B. K. (1994). Homology. The hierarchical basis of comparative biology. Academic Press, San Diego.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95–98.
- Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2018). Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 56:339-360. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050012>
- Hollomon, D. W., & Brent, K. J. (2009). Combating plant diseases - The Darwin connection. *Pest Management Science*, 65(11):156–1163. <https://doi.org/10.1002/ps.1845>

- Ishii, H. (2006). Impact of Fungicide Resistance in Plant Pathogens on Crop Disease Control and Agricultural Environment. *JARQ*, 40(3):205-211.
- Ishii, H., Fraaije, B.A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., & Hollomon, D.W. (2001). Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in 4 cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*, 91:1166-1171.
- Ishii, H. (2010). QoI Fungicide Resistance: Current Status and the Problems Associated with DNA-Based Monitoring. In *Recent Developments in Management of Plant Diseases*. Pp. 37-45 https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9_3
- Jaklitsch, W. M., Gardiennet, A., & Voglmayr, H. (2016). Resolution of morphology-based taxonomic delusions: *Acrocordiella*, *Basiseptospora*, *Blogiascospora*, *Clypeosphaeria*, *Hymenopleella*, *Lepteutypa*, *Pseudapiospora*, *Requienella*, *Seiridium*, and *Strickeria*. *Persoonia*, 37(1):82–105. <https://doi.org/10.3767/003158516X690475>.
- Jorgensen, L. N., van den Bosch, F., Oliver, R. P., Heick, T. M., & Paveley, N. D. (2017). Targeting fungicide inputs according to need. *Annual Review of Phytopathology*, 55:181–203. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035357>
- Katoh, K., & D. M. Standley. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772–780.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28:1647–1649.
- Lacomis-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataillé-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., & Simoneau, P. (2004). In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*, 23(6):481–488. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.003>
- Lawrence, D. P., Brittain, G. D., Aglave, B., & Sances, F. V. (2023). First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing crown and root rot of strawberry in

- California. *Plant Disease*, 107(2):566. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0871-PDN>
- Lecocq, T., Vereecken, N. J., Michez, D., Dellicour, S., Lhomme, P., Valterová, I., Rasplus, J. Y., & Rasmont, P. (2013). Patterns of genetic and reproductive traits differentiation in Mainland vs. Corsican Populations of Bumblebees. *PLoS ONE*, 8(6):e65642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065642>
- Lehner, M. S., Paula Júnior, T. J., Silva, R. A., Vieira, R. F., Carneiro, J. E. S., Schnabel, G., & Mizubuti, E. S. G. (2015). Fungicide sensitivity of *sclerotinia sclerotiorum*: A thorough assessment using discriminatory dose, EC50, high-resolution melting analysis, and description of new point mutation associated with thiophanate-methyl resistance. *Plant Disease*, 99(11):1537–1543. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1231-RE>
- Leigh, J. W., & D. Bryant. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Met. Ecol. Evol.*, 6:1110–1116.
- Leroux, P. (2007). Chemical Control of *Botrytis* and Its Resistance to Chemical Fungicides. In: Elad, Y., P. Williamson, and N. *Botrytis: Biology, Pathology and Control* the Netherlands Springer. pp: 195-223.
- Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., & Walker, A. S. (2010). Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the caysak agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:6615–6630.
- Leroux, P., & Walker, A. S. (2013683-693). Activity of fungicides and modulators of membrane drug transporters in field strains of *Botrytis cinerea* displaying multidrug resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4):683–693. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0105-3>
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). "Phylogenetic Relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit". *Molecular Biology and Evolution*, 16(12):1799–1808
- Liu, Y. H. Yuan, S. K., Hu, X. R. & Zhang, C. Q. (2019a). shift of sensitivity in *Botrytis cinerea* to benzimidazole fungicides in strawberry greenhouse ascribing to the rising-lowering of e198a subpopulation and its visual, on-site monitoring by loop-mediated isothermal amplification. *Scientific reports*: 9:11644.

- Liu, F., Bonthond, G., Groenewald, J. Z., Cai, L., & Crous, P. W. (2019b). Sporocadaceae, a family of coelomycetous fungi with appendage-bearing conidia. *Studies in Mycology*, 92: 287–415.
- Lucas, J. A., N. J. Hawkins, & B. A. Fraaije. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 90:29–92.
- Ma, Z., & T. J. Michailides. (2005). Advances in understanding molecular mechanism of fungicide resistance and molecular detection of resistance genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24:853–863.
- Ma, X., Qin, Y., Xiang, Y., He, L., Song, F., Wang, Z., Jiang, Y., & Wu, L. (2023). First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight on Shatangju in southern China. *Plant Disease*, 1-7. <https://doi.org/10.1094/pdis-09-22-2066-pdn>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79:121-186.
- Mertely, J. C., Forcelini, B. B., & Peres, N. A. (2017a). Root necrosis of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum*. Institute of Food and Agricultural Sciences Extension, University of Florida, Wimauma, FL. Pp. 211. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP12800.pdf>
- Mertely, J. C., Forcelini, B. B., & Peres, N. A. (2017b). Anthracnose fruit rot of strawberry. Institute of Food and Agricultural Sciences Extension, University of Florida, Wimauma, FL. PP-207. <http://edis.ifas.ufl.edu/pp130>
- Méthot, P. O., & Alizon, S. (2014). What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence*, 5(8):775-785. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.960726>
- Nieto-López, E. H., Miorini, T. J. J., Wulkop-Gil, C. A., Chilvers, M. I., Giesler, L., Jackson-Ziems, T. A., Kabbage, M., Mueller, D. S., Smith, D. L., Tovar-Pedraza, J. M., Willbur, J. F., & Everhart, S. (2023). Fungicide sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* from U.S. soybean and dry bean, compared to different regions and climates. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-07-22-1707-re>

- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7:103–116.
- Parikka, P., & Latvala, S. (2021). Soil-borne diseases increasing in Finnish strawberry production. *Acta Horticulturae*, 1309. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1309.104>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Departamento de Genética, Bioquímica e inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Spain. 25 (7):1253–1256.
- Qin, C. F., He, M. H., Chen, F. P., Zhu, W., Yang, L. N., Wu, E. J., Guo, Z. L., Shang, L. P., & Zhan, J. (2016). Comparative analyses of fungicide sensitivity and SSR marker variations indicate a low risk of developing azoxystrobin resistance in *Phytophthora infestans*. *Scientific Reports*, 6:20483. <https://doi.org/10.1038/srep20483>
- Rebollar-Alviter, A., & Ellis, M. A. (2005). Efficacy of azoxystrobin, pyraclostrobin, potassium phosphite, and mefenoxam for control of strawberry leather rot caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Health Progress*, 6(1): <https://doi.org/10.1094/php-2005-0107-01-rs>
- Rebollar-Alviter, A., Madden, L. v., Jeffers, S. N., & Ellis, M. A. (2007). Baseline and differential sensitivity to two QoI fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. *Plant Disease*, 91(12):1625–1637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-12-1625>
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., & Parra-Robles, B. E. (2020). An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease*, 104(8):2054-2059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>
- Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98(6):625–634.
- Rodrigues, F. A., Silva, I. T., Antunes Cruz, M. F., & Carré-Missio, V. (2014). The infection process of *Pestalotiopsis longisetula* leaf spot on strawberry leaves.

- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61:539–542.
- Rotondo, F., Klass, T. L., Scott, K., McCartney, M., Jacobs, J. M., & Lewis Ivey, M. L. (2023). First report of *Neopestalotiopsis* disease in Ohio caused by an emerging and novel species of *Neopestalotiopsis* on *Strawberry*. *Plant Disease*, 107(3):940. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-22-0400-pdn>
- Rouabhi, R. (2010). Introduction and Toxicology of Fungicides. In *Fungicides*. <https://doi.org/10.5772/12967>
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-Del Barrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, E. E. Ramos-Onsis, & A. Sánchez-Gracia, (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34.3299–3302.
- Russell, P. E. (2008). Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. *Outlooks on Pest Management*, 17(3).
- Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., Kirchhofer-Allan, L., Steinhauer, D., Ward, K., Niklaus, M., Verras, A., Csukai, M., Daina, A., & Fonné-Pfister, R. (2012). Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE*, 7(4):e35429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429>
- Senanayake, I. C., Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Jayarama, D., Jones E. B., McKenzie, E. H. C., Dai, D. Q., Daranagama, D. A., Dayarathne, M. C., Goonasekara, I. D., Konta, S., Li, W. J., Shang, Q. J., Stadler, M., Wijayawardene, N. N., Xiao, Y. P., Norphanphoun, C., Li, Q., Liu, X. Z., Bahkali, A. H., Kang, J. C., Wang, Y., Wen, T. C., Wendt, L., Xu, J. C., & Camporesi, E. (2015). Towards unraveling relationships in Xylariomycetidae (Sordariomycetes). *Fungal Diversity*, 73(1):73–144. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0340-y>.
- Shin Gil-Ho, Hur, J.-S., & Koh Young Jin. (2000). Chemical control of gray blight of tea in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 16(3):162–165. <https://www.researchgate.net/publication/263639287>

- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., & Gisi, U. (2000). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science*, 56(10): 833. [https://doi.org/10.1002/1526-49984998\(200010\)56:10<833:AID-PS200>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1526-49984998(200010)56:10<833:AID-PS200>3.0.CO;2-Q)
- Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Org. 271 Divers. Evol.* 12:335–337.
- Stammler, G., & Speakman, J. (2006). Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to boscalid. *Journal of Phytopathology*, 154:7–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01139.x>
- Sober, E. (1988). *Reconstructing the past Parsimony, Evolution and Inference*. MIT Press, Cambridge.
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., Yan, J., Zhang, W., & Li, X. (2021). Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Protection*, 147:105710. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105710>
- Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., Spatafora, J. W., & Shin, H. D. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycology*, 57: 5-59.
- Tanaka, K., Endo, M., Hirayama, K., Okane, I., Hosoya, T., & Sato, T. (2011) Phylogeny of *Discosia* and *Seimatosporium*, and introduction of *Adisciso* and *Immersidiscosia* genera nova. *Persoonia*, 26(1):85–98. <https://doi.org/10.3767/003158511X576666>
- Torres-Londoño, G. A., Hausbeck, M., & Hao, J. (2016). ECX: An R package for studying sensitivity of antimicrobial substances using spiral plating technology. *Plant Health Progress*, 17(3):188–194. <https://doi.org/10.1094/PHP-RS-16-0020>
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., & Karaoglanidis, G. S. (2011). Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease*, 95(10), 1302–1307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0317>

- Veloukas, T., Markoglou, A. N., & Karaoglanidis, G. S. (2013). Differential effect of *sdhB* gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 97:118–122.
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8):4238–4246.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: PCR Protocols: A guide to methods and applications. M. A. innis, D. H. Gelfand, J. J. Snisky and J. J. White, eds. Academic press, San Diego, CA.
- Widyaningsih, S., & Triasih, U. (2021). Biological control of strawberry crown rot disease (*Pestalotiopsis* sp.) using *Trichoderma harzianum* and Endophytic Bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 752(1): 012052. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/752/1/012052>
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Wanasinghe, D. N., Papizadeh, M., Goonasekara, I. D., Camporesi, E., Jayarama Bhat, D., McKenzie, E. H. C., Phillips, A. J. L., Diederich P., Tanaka, K., Li, W. J., Tangthirasunun, N., Phookamsak, R., Dai, D. Q., Dissanayake, A. J., Weerakoon, G., Maharachchikumbura, S. S. N., Hashimoto, A., Matsumura, M., Bahkali, A. H., & Wang Y. (2016). Taxonomy and phylogeny of dematiaceous coelomycetes. *Fungal Diversity*, 77(1):1–316. <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0360-2>.
- Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., & Chung, P. C. (2021). First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Disease*, 105(2):487–487. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1045-PDN>
- Yamada, K., & Sonoda, R. (2012). Characterization of moderate resistance to QoI fungicides in *Pestalotiopsis longiseta* and polymorphism in exon-intron structure of cytochrome b gene. *Journal of General Plant Pathology*, 78:398–403. DOI: 10.1111/jph.12715
- Yang, L. N., He, M. H., Ouyang, H. B., Zhu, W., Pan, Z. C., Sui, Q. J., Shang, L. P., & Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria*

alternata to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>

- Yin, D., Chen, X., Hamada, M. S., Yu, M., Yin, Y., & Ma, Z. (2015). Multiple resistance to QoIs and other classes of fungicides in *Botrytis cinerea* populations from strawberry in Zhejiang Province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1):169–177. [Ht-tps://doi.org/10.1007/s10658-014-0535-1](https://doi.org/10.1007/s10658-014-0535-1)
- Yong, Y. C., Chen, Y. J., Fang, B. Y., & Chung, W. H. (2014). Sensitivity of *Pestalotiopsis* spp. from guavato benzimidazoles in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 23(3/4): 271–275.
- Ziogas, B. N., & Malandrakis, A. A. (2015). Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 Demethylation (DMIs). In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. pp, 199-216. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13
- Zuniga, A. I., Oliveira, M. S., Rebello, C. S., & Peres, N. A. (2020). Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates from strawberry to isofetamid compared to other SDHIs. *Plant Disease*, 104(4):1224–1230. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1140-RE/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-06-19-1140-RE_T4.JPEG