



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE AGROECOLOGIA

MAESTRIA EN MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

**Estudio de la relación de hongos asociados al cultivo de fresa y
su respuesta a la inoculación del bio-gel fúngico a base de
Trichoderma sp., *in vitro***

PRESENTA

Luis Angel Morales Mora

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Omar Romero Arenas

ASESORES

Dr Nemesio Villa Ruano

Dr José Antonio Rivera Tapia

MC. Arturo Parra Suárez

REVISOR: Dr Carlos Alberto Contreras Paredes

Puebla, Pue., 03,2022

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento de esta tesis va dirigido a varias personas, pero, sobre todo, primeramente, agradezco a Dios, todo a su voluntad, ya que esta etapa de mi vida ha sido la de mayores cambios a mi alrededor y en mi persona. Gracias a mis familiares más cercanos, círculos de amigos y profesores, en especial a los integrantes de mi comité de tesis, que sin el apoyo de alguno de ellos esto jamás habría sido posible. Como es evidente, también estoy y estaré perpetuamente agradecido con la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) por haberme dado la oportunidad de haber cursado y culminado el programa de “Maestría en Ciencias del Manejo Sustentable de Agroecosistemas” en el periodo de agosto de 2019 - 2021. Al mismo tiempo, agradezco a todo el personal académico y administrativo del posgrado por haberme guiado y prestado de su tiempo y servicios para lograr este objetivo más en mi vida profesional.

En otras líneas también agradezco al CONACYT por haberme otorgado la beca nacional con la cual logre cubrir mis gastos con objeto de investigación y obviamente gastos personales durante este periodo, también agradezco, por último, pero no menos importante, el apoyo de la dirección de la Vicerrectoría de Posgrados de la BUAP, la cual me apoyo con la beca de culminación del programa de tesis en las etapas finales de este proyecto. De todo corazón, gracias a todos por haberme apoyado en este camino.

“Los hongos que causan enfermedades pueden ser un enemigo temible. Conocer los mecanismos con los que atacan y la forma en que éstos han evolucionado, nos ayudará a enfrentarlos más eficientemente.”

>> Gilberto Manzo, Blondy Canto y Andrew James <<

CONTENIDO

1. Introducción	6
2. Antecedentes.....	7
i. Generalidades del cultivo	7
a) Morfología de la planta de fresa	7
b) Cualidades nutritivas del fruto.....	8
ii. Producción de fresa en el mundo y México.....	9
c) Producción Nacional de fresa	11
iii. Principales sistemas de producción.....	12
a) Sistema de producción convencional	13
b) Sistema orgánico y prácticas encaminadas al desarrollo sustentable	14
c) Polinización con insectos en macro túneles plásticos	15
d) Cultivos en sistemas elevados bajo condiciones de invernadero	15
e) Biosolarización.....	16
f) Efecto del uso de abonos orgánicos en la fertilización del cultivo	16
iv. enfermedades de las plantas causadas por hongos.....	18
a) Patogénesis fúngica.....	18
b) Principales hongos fitopatógenos asociados al cultivo de fresa	21
v. Control de enfermedades fúngicas en el cultivo de fresa	23
a) Hongos como agentes de control biológico.....	25
b) El género <i>Trichoderma</i>	25
c) Formulados biológicos o bioinoculantes.....	26
d) Tipos de presentación de los bioinoculantes.....	27
vi. Generalidades de la encapsulación	28
a) Encapsulación por pulverización	29
b) Encapsulación por lecho fluidizado.....	29
c) Coacervación	30
d) Gelificación iónica	30
vii. Encapsulamiento de <i>Trichoderma</i> sp.	31
3. Planteamiento del problema	33
4. Justificación	34
5. Hipótesis.....	35
6. Objetivos	35

viii. General	35
ix. Específicos.....	35
7. Materiales y métodos	36
i. Zona de muestreo	36
a) Aislamiento y purificación	36
ii. Identificación y caracterización morfométrica	37
b) Tasa de crecimiento micelial	37
c) Morfología macro y microscópica	38
d) Identificación molecular.....	38
e) Análisis de secuencias y Filogenia.....	39
iii. Evaluación de los postulados de Koch.....	42
f) Ensayos sobre trifolios en cámaras húmedas.....	42
g) Ensayos sobre frutos en placas de Petri	43
h) Ensayos sobre plantas adultas en maceta	44
i) Ensayos sobre plántulas germinadas	46
j) Inmovilización de los conidios de <i>Trichoderma</i> sp.	48
k) Caracterización de los encapsulados	49
l) Fotoestabilidad	50
m) Pruebas de antagonismo.....	51
n) Clasificación de los antagonismos	52
8. Resultados.....	53
i. Caracterización e identificación de los hongos.....	53
a) Aislamiento y purificación	53
b) Caracterización morfométrica	53
c) Identificación molecular.....	59
d) Filogenia	60
e) Postulados de Koch	63
f) Encapsulación de conidios de <i>Trichoderma</i> sp.....	70
g) Caracterización de los encapsulados	72
h) Fotoestabilidad	75
i) Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM)	79
j) Categorías de los antagonismos	85

9.	Discusión.....	87
	a) Identificación y caracterización morfológica, molecular y patogénica de los hongos aislados del cultivo y su respectivo PICM	87
	b) Efecto de protección ejercido por la encapsulación sobre las cepas de <i>Trichoderma</i> sp.	90
10.	Conclusiones	91
11.	Referencias.....	92

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de fresa (*Fragaria* × *ananassa*) destaca a nivel global por sus cualidades nutritivas, el impacto económico que genera en las zonas de producción y por la variedad de usos que tiene en la industria de alimentos (Mazzoni *et al.*, 2016). Se trata de diversas plantas pertenecientes a la familia Rosaceae, no obstante, la especie predominante a nivel global es *Fragaria* × *ananassa* producto de hibridaciones entre *F. virginiana* y *F. chiloensis* (Darrow, 1966). Si bien, los esfuerzos genéticos por obtener una variedad a la altura de sabor, tamaño y resistencia a diversos patógenos superior a las variedades actuales han sido “aceptables” el enfoque sigue siendo tema de discusión y reflexión bioética para la comunidad científica (Yunta, 2013). Sin embargo, lo que sí es claro es el impacto que tiene las enfermedades fúngicas sobre este cultivo, situándose entre las principales limitaciones en su producción además de que infligen pérdidas significativas para las zonas dedicadas a este cultivo (Rubio *et al.*, 2014). En países en desarrollo el control de enfermedades del cultivo de fresa se logra en cierta medida empleando pesticidas, desafortunadamente esta tarea tiene desventajas, principalmente el costo elevado de los pesticidas y el impacto negativo sobre el ambiente y los consumidores, en algunos casos, puede traer más desventajas que beneficios debido a las altas dosis frecuentes que se aplican (Rebollar *et al.*, 2011). Frente a este panorama se plantea el control biológico como principal alternativa de manejo de enfermedades fúngicas, específicamente haciendo uso de bioinoculantes a base de organismos antagónicos, esto parece ser un método económicamente viable y ecológicamente sostenible (Khan y Anwer, 2011). En general, los bioinoculantes son efectivos contra hongos transmitidos por semillas y suelos. Sin embargo, una limitación importante en su uso es la falta de disponibilidad de sistemas de inmovilización eficientes para la entrega y supervivencia de su agente de control biológico. Por ende, este trabajo tiene como objetivo evaluar la encapsulación de esporas de *Trichoderma* sp., como potencial “bioproducto” para inhibir el desarrollo de hongos asociados y fitopatógenos del cultivo de fresa en condiciones *in vitro*, además de evaluar la fotoestabilidad de los encapsulados y dilucidar los postulados de Koch de los hongos asociados al cultivo.

2. ANTECEDENTES

I. GENERALIDADES DEL CULTIVO

La fresa (*Fragaria* × *ananassa*) es un cultivo estimado y presente alrededor de todo el mundo, ejemplares antecesores de la misma se conocen desde tiempos antiguos, existen registros históricos sobre la introducción de parientes de estas plantas desde Virginia de los Estados Unidos a Francia a mediados del siglo XIX (Galetta y Himelrick, 1989). Además, en la época de 1770 se realizarían cruces experimentales de especies chilenas y norteamericanas con especies europeas, así hasta la obtención de una variedad a la altura de sabor, tamaño y resistencia a distintas enfermedades, convirtiéndose en la actualidad en un cultivo prestigioso y querido por sus cualidades nutraceuticas y valor económico (Darrow, 1966). Las especies de fresa pertenecen al género *Fragaria* descrito por Carlos Lineo en 1753, refiriéndose principalmente a la especie tipo *Fragaria vesca* L (Hansen y Maule, 1973). Sin embargo, todas las fresas son miembros de la familia Rosaceae, a la cual pertenecen cultivos económicamente importantes (Warner *et al.*, 2021). A la fecha actual se han descrito unos 400 taxones, de los cuales solo unos 20 están aceptados (Darrow, 1966). El sumo interés de los programas de investigación universitarios de todo el mundo, las empresas privadas de mejoramiento del cultivo, los agricultores de traspatio y de pequeña escala por cultivar fresas es debido a su infrutescencia, su delicioso sabor, su inusual e interesante viaje evolutivo (Rubinstein, 2015). A menudo las variedades cultivadas comercialmente son híbridos entre las especies de *F. virginiana* del este de Norte América y *F. chiloensis* de Chile, en especial *Fragaria* × *ananassa*, que ha reemplazado casi universalmente a las especies silvestres locales, como la eurasiática *F. vesca*, por el superior tamaño de sus frutos y su sabor dulce.

a) Morfología de la planta de fresa

Las plantas de fresa son plantas herbáceas, perennifolias, que poseen un sistema radicular que penetra hasta 80 cm de profundidad en el suelo, se origina a partir de la corona y comprende 2 tipos de raíces: primarias y secundarias, las primeras hacen de soporte y estructura del sistema radicular y de la planta, en

cambio, las secundarias absorben los nutrientes ubicados en su rizosfera además de almacenar sustancias de reserva. La corona es la parte central de la planta, esta descansa sobre la superficie del suelo, se le considera un tallo comprimido del cual se forman las yemas axilares y dan origen a crecimiento vegetativo. Los tallos son generalmente simples, más o menos erectos. Las hojas se agrupan en falsas rosetas, con los segmentos ovalo-rómbicos, distalmente dentados. Son pinnadas, trifoliadas por lo general de color verde oscuro. En las axilas se forman yemas vegetativas que dan origen a las inflorescencias, estas se organizan en cimas con brácteas. Las flores, hermafroditas o funcionalmente unisexuales, tienen un receptáculo con la zona axial parcialmente cónica, acrescente y carnosa en la fructificación. Cada flor perfecta está constituida por un cáliz compuesto por 5 sépalos los cuales son lanceolados y en general enteros, más o menos acrescentes, erectos, patentes o reflejos en la fructificación. El fruto es un poliaquenio de aquenios ovoides incrustados en dicho receptáculo (eterio) que se vuelve carnoso al madurar. El receptáculo maduro tiene hasta 5 cm de diámetro de formas achatada, globosa, cónica alargada, en cuña alargada, y en cuña corta, varía entre colores rosados, purpura o rojo carmín (Darrow, 1966).

b) Cualidades nutritivas del fruto

Actualmente la fresa es reconocida como un alimento funcional o “superalimento” debido a la plétora de beneficios que ofrece tras consumirla, impactando de forma benéfica la salud de sus consumidores (Olas, 2018). El consumo de fresas ayuda al equilibrio de las especies reactivas de oxígeno dada la cantidad de antioxidantes que posee (Bartosz y Sadowska, 2015). Se puede mencionar la capacidad antioxidante como un efecto directo que tienen las fresas tras consumirlas, pero concordando con Battino (2020), no podía ser la única actividad atribuible a los efectos beneficiosos que ejercen las fresas, especialmente si se considera que la biodisponibilidad de los antioxidantes dietéticos es generalmente baja y que, tras la digestión, sus metabolitos adquieren nuevas estructuras y funciones químicas (Ansary y Cianciosi, 2020). Además, de ser la baya más consumida debido a sus múltiples usos como productos frescos o procesados,

se encuentra entre los alimentos con mayor cantidad y variedad de compuestos bioactivos, debido a su alto valor nutricional y fitoquímico (Mazzoni *et al.*, 2016). El papel que juegan los compuestos bioactivos presentes en las fresas influye en niveles de modulación genética, destacando en la expresión de varios genes y proteínas involucradas en diferentes procesos celulares, entre los que se encuentran la apoptosis, inflamación, defensa antioxidante, metabolismo lipídico y biogénesis mitocondrial (Battino, 2020).

II. PRODUCCIÓN DE FRESA EN EL MUNDO Y MÉXICO

En el último informe estadístico de la (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database 2021) [FAOSTAT], en el año 2019 China, Estados Unidos y México fueron los principales países productores de fresa, aportando en conjunto un 68.7 % de la producción global. Para el año 2019 la producción global fue aproximadamente de 12,106,585 toneladas, siendo la aportación de México aproximadamente de 861,337 toneladas, siendo superado por los países de Estados Unidos de América y China, los cuales generaron cerca del 61.6 % de la producción global, pues entre los 2 países su producción se registró cerca de las 7,455,861 toneladas para ese mismo año. En la figura 1 se agruparon los 15 países con mayor producción de fresa para el 2019, los cuales en conjunto generaron un 90.7 % de toda la producción de fresa el mundo.

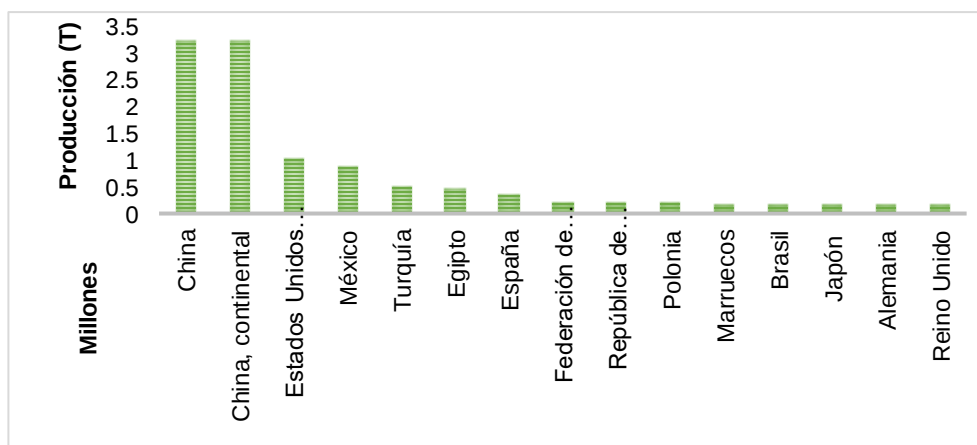


Figura 1. Top 15 de los países productores de fresa en 2019 (FAOSTAT, 2021).

En cuanto a la superficie destinada a la producción de este cultivo, el lugar de los países cambia, podemos observar que los 3 países con mayor área registrada para este cultivo en 2019 fueron: China, con 251 mil 763 hectáreas, seguido de Polonia (49 mil 900 hectáreas) y la Federación Rusa con 31 mil 122 hectáreas (FAOSTAT, 2021). En la figura 2 se muestran los 15 países con mayor uso de suelo destinado a este cultivo en sus respectivos territorios.

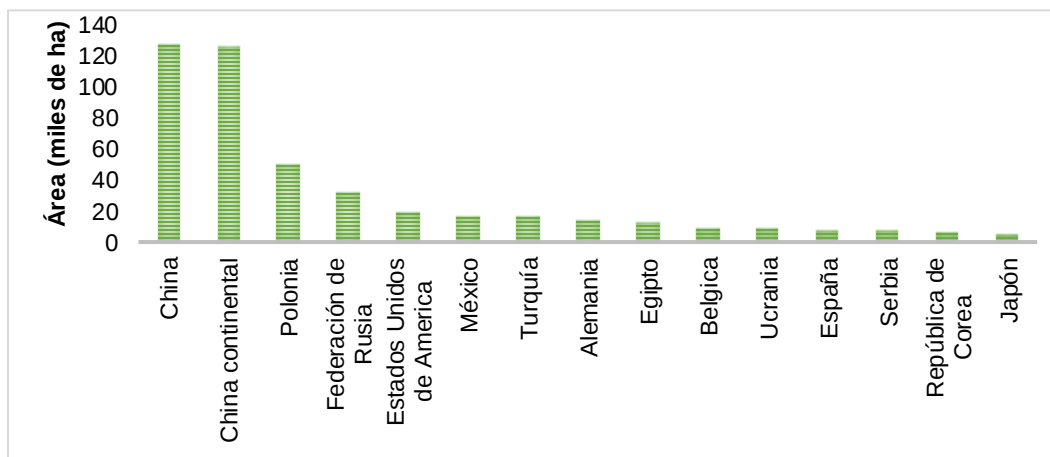


Figura 2. Top 15 de la superficie destinada para cultivo de fresas en 2019 (FAOSTAT, 2021)

Finalmente, los 15 países con mejores rendimientos considerando las toneladas producidas por el área dedicada al cultivo de fresa (figura 3). Sorprendentemente países como China, la Federación Rusa y Polonia quienes destacaban por su producción y superficies destinadas para el cultivo de fresa, no son considerados por su rendimiento, no obstante, el uso eficiente es un tema de debate para otra investigación. En cuanto al mejor rendimiento para el año 2019 se registró en Estados Unidos de América con 56 mil 342.5 Kg/ha, seguido por México con un rendimiento de 524,278 hg/ha y en tercer lugar el país de Marruecos con 485751 hg/ha. Además, de que se incluyeron países como Chipre y Kuwait (FAOSTAT, 2021).

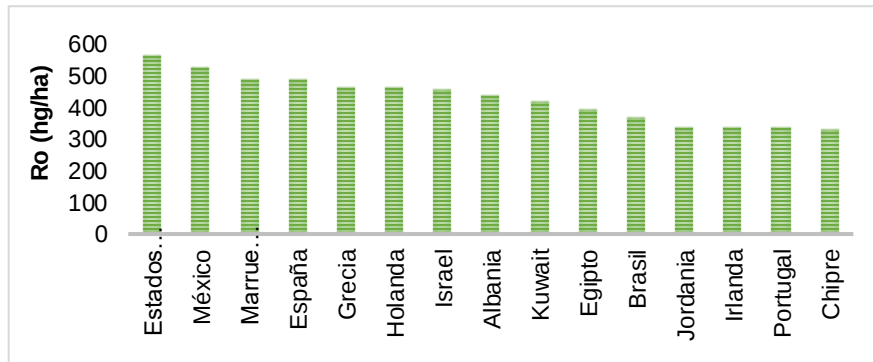


Figura 3. Top 15 de los países con mejor rendimiento en la producción de fresa en 2019 (FAOSTAT, 2021).

c) Producción Nacional de fresa

En México la producción de fresas ha evolucionado a lo largo de los últimos 10 años (figura 4), pero para el 2020 la producción global se aproximó a las 12,961.56 ton (SIAP, 2021) (Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera) siendo el estado de Michoacán el mayor productor con 7,388.17 ton y entre los principales municipios de esta entidad que se dedican a esta actividad se encuentran Zamora, Sahuayo, La Piedad, Pátzcuaro, Morelia y Zitácuaro (SIAP, 2021). A lo largo de la última década la producción recae en tres principales estados, los cuales son Michoacán, Jalisco y Tlaxcala (figura 4). Mientras que Puebla se colocó en octava posición con una producción, cercana a las 17.27 ton, de las cuales los municipios de Chignahuapan, Zacatlán, Cuyoaco, San Nicolás Buenos Aires y Tlachichuca son los principales productores. En Puebla la producción ha tenido notables avances desde el año 2017 (figura 5) donde su rendimiento comenzó a mejorar y se mantiene hasta la fecha en 77.5 ton/ha en promedio, lo cual es mucho mejor que en años anteriores.

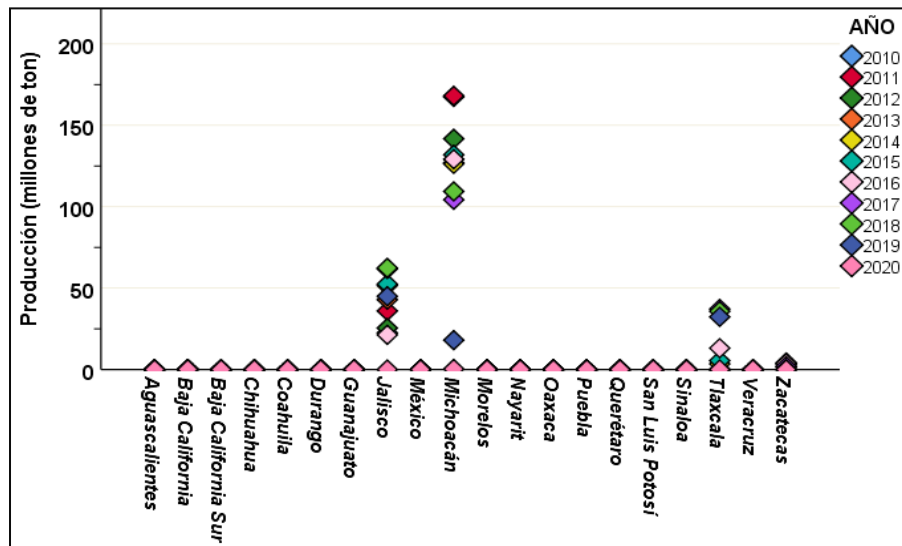


Figura 4. Producción Nacional de Fresa a lo largo del periodo 2010-2021 (SIAP, 2020).

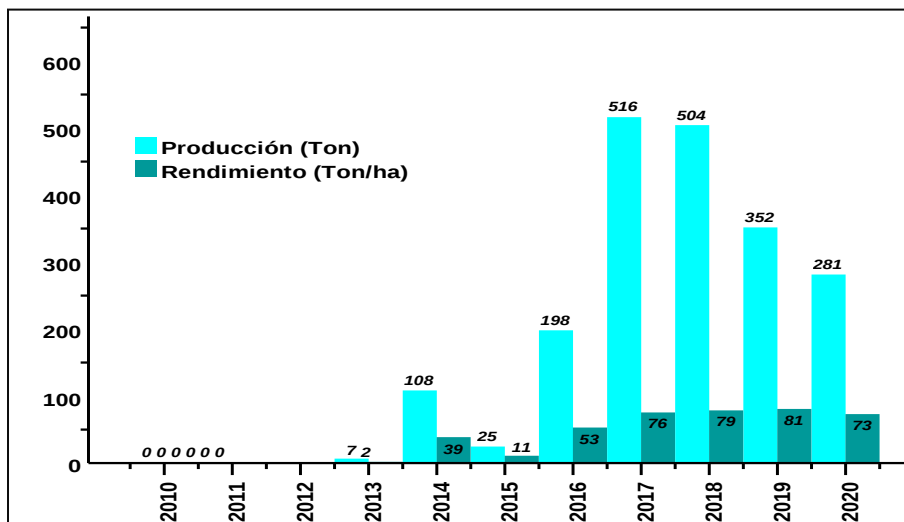


Figura 5. Comparación entre Rendimiento y Producción de fresa en Puebla durante el periodo 2010-2020 (SIAP, 2020).

III. PRINCIPALES SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

Las fresas se pueden encontrar de forma silvestre en distintas partes del mundo, pero la fresa que se cultiva es el híbrido *Fragaria x ananassa* Duch. Si bien, se considera que la fresa tiene un óptimo desarrollo en regiones con climas templados, también se le puede encontrar en climas tropicales y subtropicales. La adaptación de la planta se debe a la versatilidad de su manejo para cultivarla, desde huertos caseros, macetas decorativas, cestas colgantes hasta camas planas o

elevadas, así como en estructuras protegidas con cubiertas vegetales o simplemente suelos arenosos (Figura 6). Estos subsistemas se pueden clasificar de acuerdo a la metodología usada para producir, es decir si las fresas son producidas con metodologías industriales empleando maquinaria moderna o tradicionales usando maquinaria rudimentaria, y si el manejo del cultivo es convencional, ecológico, orgánico, integrado etcétera (Mixquitlla-Casbis *et al.*, 2020).



Figura 6. Principales sistemas de producción de la fresa. a) Sistema protegido y en estructuras elevadas, b) Sistema de cestas colgantes a campo abierto, c) sistema de camas elevadas en campo y d) sistema de cestas colgantes.

a) Sistema de producción convencional

La producción de fresa en un sistema convencional está basada principalmente en los paquetes tecnológicos provenientes de las últimas investigaciones en el uso intensivo de insumos de síntesis química, así como; fertilizantes, plaguicidas, promotores de crecimiento, estructuras de protección etcétera., lo cual promueve la intensificación de monocultivos y el uso de tecnología

específica para satisfacer la alta demanda del mercado, además costos elevados asociados principalmente al uso de fitoquímicos e insumos químicos dirigidos al suelo. Una de las principales preocupaciones de este sistema es la aplicación de bromuro de metilo en combinación con cloropicrina (Duniway, 2002) como agentes para el control de patógenos, malezas y nematodos transmitidos por el suelo, mediante tratamientos que consisten en la fumigación directa del suelo con aspersión ya sea a pequeña o gran escala. Sin embargo y a pesar de que se ha ejecutado la prohibición de estos compuestos en distintas partes del mundo por tratados internacionales como el Protocolo de Montreal en 1989, en algunos lugares aún se sigue haciendo uso de estos químicos y algunas alternativas de la misma naturaleza, ejemplo de estos son la cloropicrina y el 1,3-dicloropropeno, pero aún sigue siendo debate de si su uso debe ser prohibido como el caso del bromuro de metilo o si se debe permitir bajo regulación. Debido a esta incertidumbre, se han investigado nuevas alternativas químicas (Ajwa y Othman, 2013), y surge la conveniencia de un cambio hacia un sistema en crecimiento cada vez menos dependiente de los químicos. En este sentido, varios grupos de investigación están estudiando diferentes alternativas físicas o biológicas para la desinfestación no química del suelo en la producción de fresa como vaporización, cultivo sin suelo, solarización del suelo, biofumigación y otras (Daugovish *et al.*, 2013, y Fennimore *et al.*, 2013).

b) Sistema orgánico y prácticas encaminadas al desarrollo sustentable

Las prácticas de índole orgánica van de la mano con la premisa de desarrollar metodologías respetuosas con el ambiente y con la salud de los consumidores, existen registros donde los productores han desarrollado prácticas con el fin de buscar la certificación de sus sistemas hacia la producción orgánica de fresa. Esto debido al uso excesivo de fertilizantes químicos y pesticidas, especialmente en aquellas frutas, que se pueden comer sin quitar la cáscara, como la fresa, porque son perjudiciales para la salud humana. Enseguida se describen algunas de las prácticas desarrolladas por distintos actores para la producción orgánica de fresa.

c) Polinización con insectos en macro túneles plásticos

Una de las prácticas que se ha venido perfeccionando es la polinización de cultivos protegidos, en la que se emplean principalmente abejas o abejorros, con esto se aumenta la movilidad de los gránulos de polen promoviendo una fertilización adecuada de los óvulos y el desarrollo de achenios (Khalifa *et al.*, 2021). Una ventaja adicional de ser cultivos protegidos con túneles o macro túneles plásticos de polietileno consiste en minimizar el efecto de las adversidades climatológicas asegurando un aumento en el rendimiento de frutos permitiendo el desarrollo óptimo de los achenios en comparación con los cultivos tradicionales a campo abierto (Koukounaras, 2021). Es así como, estas dos prácticas en conjunto mejoran el desarrollo de los frutos, por un lado, la polinización con abejorros bajo túneles de plástico disminuye la incidencia de frutos deformados en cultivos de fresa y, por lo tanto, aumenta el rendimiento de frutos (Macharia *et al.*, 2020), por otro lado, los túneles de plástico protegen y promueven la precocidad de la fruta y esto permite a los productores producir sus fresas frescas durante la venta de mercado fuera de temporada (Salamé-Donoso *et al.*, 2010).

d) Cultivos en sistemas elevados bajo condiciones de invernadero

Los sistemas elevados o suspendidos en condiciones de invernadero son una alternativa para evitar el uso de fumigantes de suelo en la producción de fresa. No obstante, son sistemas con un alto grado de implementación tecnológica lo cual requiere de una gran inversión económica inicial debido al nivel de automatización, además, se exige capacitación para los productores en el uso correcto del invernadero y comprensión del sistema de producción suspendida de la fresa. Por lo general este tipo de producción incluye un sistema cerrado de ciclo de nutrientes que reducen los costos de fertilizantes y las pérdidas de nutrientes por drenaje evitando la contaminación ambiental. Su configuración implica el uso de tecnología avanzada en comparación con los sistemas convencionales de cultivo de fresa, y requiere que los agricultores tengan una formación adecuada y específica. Por ende, los cultivos deben mantener una producción de alta calidad y unos precios de mercado elevados para que el sistema sea rentable (Hussain *et al.*, 2014).

López Medina (2008) enlista las siguientes ventajas de los sistemas sin suelo:

- 1) Uso eficiente del agua y nutrientes, control de los factores ambientales que afectan el crecimiento y rendimiento de las plantas.
- 2) No existe el uso de fumigantes para desinfestar suelo.
- 3) Se pueden tener una mayor densidad de plantas en espacios más reducidos.
- 4) Las infecciones por hongos son nulas debido a que las plantas se airean mejor y las hojas y frutos se mantienen secos.
- 5) Se minimizan los desechos y los sustratos orgánicos se pueden reutilizar o aplicar como enmiendas orgánicas, y las bolsas de plástico se pueden reciclar.

e) Biosolarización

Esta práctica se aplica para los cultivos en campo de fresa previo a su plantación, esta consiste en tapizar el sitio de interés con enmiendas orgánicas como por ejemplo estiércol de animales preferentemente fresco, solos o combinados con restos vegetales, posteriormente se cubre con mantillo toda la superficie y se deja solarizar por periodos de 30 a 40 días. Domínguez *et al.* (2014), demostraron que el uso de enmiendas orgánicas como el estiércol de pollo fresco adicionado con *Trichoderma* spp., promueve rendimientos más altos con un promedio de 70,543 kg/ha y el porcentaje más bajo de 12.6% de frutos de segunda clase y se obtienen resultados similares a los rendimientos más altos reportados previamente para la fumigación química con 1,3-dicloropropeno y cloropicrina. Además, la biosolarización es aproximadamente un 20% más barata que el tratamiento con 1,3-dicloropropeno y cloropicrina. La biosolarización con estiércol de pollo es, por tanto, una opción sostenible prometedora para la producción de fresa.

f) Efecto del uso de abonos orgánicos en la fertilización del cultivo

El uso de abonos orgánicos como sustitutos de químicos sintéticos representa una alternativa sostenible para el cultivo de fresa, pero debe de ser una

transición progresiva y sustentada (Mena *et al.*, 2017). En parte, esta transición se ve afectada por la baja disponibilidad de fertilizantes orgánicos clásicos como el estiércol y la escasa información de los efectos de nuevos tipos de fertilizantes como los extractos de plantas, o inóculos microbianos (Chughtai *et al.*, 2018), estos últimos son conocidos como biofertilizantes y difieren de los abonos orgánicos clásicos, sus principales efectos se tratarán más adelante. En cuanto a los abonos orgánicos tenemos al ácido húmico, los extractos de algas marinas, y los aminoácidos a partir de restos vegetales o animales como fuentes orgánicas con efectos biorreguladores, y según lo mostrado por Chughtai *et al.* (2018), el uso de aminoácidos vegetales puede impactar de forma benéfica sobre parámetros vegetativos como biomasa vegetal, número de hojas y área foliar, además de características reproductivas, como el número de frutos, rendimientos, concentración de azúcares totales y sólidos solubles. Otra propuesta a la sustitución completa de los fertilizantes químicos por abonos orgánicos es la de su uso combinado y además potenciado con biofertilizantes, Khalil y Agah (2017), usaron distintas combinaciones: 1) Fertilizante mineral 100%, dosis recomendada de NPK, 2) Fertilizante mineral 50% + fertilizante orgánico (Extracto de Manure Black Force), 3) Fertilizante mineral 50% + Biofertilizante (Biohelth) (F3), 4) Fertilizante mineral 50% + fertilizante orgánico + Biofertilizante, 5) Fertilizante orgánico + fertilizantes minerales en aplicación foliar (Karma), y 6) Biofertilizante + Fertilizante orgánico + Fertilizantes minerales en aplicación foliar, para ver el efecto de la fertilización química, orgánica y biológica sobre el crecimiento y el rendimiento de la planta de fresa, sus estudios apuntan a que la mejor alternativa es el uso combinado de fertilizantes orgánicos y biológicos con fertilizantes minerales en un 50 % para mejorar características del crecimiento, rendimiento y calidad de la fresa. Además, de los aspectos fisiológicos de la planta, también las características físico-químicas y biológicas de la rizosfera se ven afectadas por el uso de abonos orgánicos, principalmente las concentraciones de carbono orgánico, la capacidad de intercambio catiónico, niveles de Fósforo y Nitrógeno disponibles en el suelo. Yadav *et al.* (2016), reportaron que el uso de estiércol de corral en combinación con fertilizantes químicos inorgánicos en partes iguales puede aumentar el contenido de

carbono orgánico y la capacidad de intercambio de catiónico del suelo en comparación con el uso de cada uno por separado. Además, Yadav *et al.*-(2016), también registraron que los tratamientos donde se aplicó Vermicompost, fertilizantes inorgánicos y un inoculante de *Azotobacter* sp., aumentaron el contenido de nitrógeno disponible en la rizosfera de las plantas.

IV. ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS CAUSADAS POR HONGOS

En la actualidad difícilmente se podría imaginar que existan organismos que no estén o hayan estado bajo la influencia de los hongos, ya que los hongos pueden estar asociados como saprofitos, parásitos o como vectores de enfermedades (Castillo, 1987). Podemos encontrarlos creciendo sobre materia orgánica en descomposición, parasitando a invertebrados y vertebrados, así como sobre algas y plantas superiores en donde son causantes de serios estragos en la producción (Castillo, 1987). Por ende, se considera que los hongos se encuentran entre los agentes causales dominantes de las enfermedades de las plantas. Haciendo hincapié en los hongos fitopatógenos, se les puede considerar Necrotrofos a los hongos patógenos que matan a sus huéspedes y se alimentan de material muerto, mientras que otros colonizan el tejido vivo y se les conocen como hongos patógenos biótros (Doehlemann *et al.*, 2017). Si bien básicamente todos los patógenos interfieren con la defensa primaria de la planta, los necrótrofos secretan toxinas para matar el tejido vegetal. Por el contrario, los biótrosos utilizan moléculas efectoras para suprimir la muerte de las células vegetales y manipular el metabolismo de las plantas a favor del patógeno (Doehlemann *et al.*, 2017).

a) Patogénesis fúngica

El desarrollo de una infección causada por hongos comienza desde las esporas, estas comienzan su viaje en busca de superficies a las que puedan adherirse, ya sean superficies vegetales de su hospedero o no, en el primer caso, gracias a la acción del viento, el agua u otros vectores incluyendo los insectos, las esporas pueden llegar a superficies de tejido vegetal de sus hospederos y adherirse

a través de la secreción de una matriz extracelular adhesiva. En modelos fúngicos como *Magnaporthe grisea* se ha estudiado este patosistema, Hamer *et al.* (1988), demostraron que las esporas almacenan mucilago en un compartimiento periplásmico en el ápice conidial, y tras hidratarse los conidios se rompen liberando este mucilago que dado que funciona como matriz fibrosa hace posible la adhesión a la superficie de distintos materiales incluyendo superficies de tejido vegetal de su hospedero, sus evidencias quedaron plasmadas en micrografías electrónicas y de contraste de luz de conidios antes y después de hidratarse (figura 7). Posteriormente al proceso de adhesión, da inicio el proceso de penetración, donde muchos hongos fitopatógenos comienzan a diferenciar una estructura de infección especializada llamada apresorio, con éste apresorio pueden penetrar la cutícula y la pared celular de sus huéspedes (Kleemann *et al.*, 2012). En modelos fúngicos de estudio como *Colletotrichum* spp., se han desvelado las características clave para el desarrollo exitoso de un apresorio que conseguirá penetrar en su huésped, En palabras de Kleemann *et al.* (2012) se entiende que dichas características claves son (a) una pared celular melanizada que actúa como una barrera semipermeable a los osmolitos, (b) acumulación de glicerol para generar turgencia y (c) una matriz extracelular para anclar la célula y contrarrestar las fuerzas mecánicas descendentes aplicadas durante la penetración. El apresorio se adhiere firmemente a la superficie del huésped y aplica una fuerza mecánica impulsada por la turgencia sobre una clavija de penetración delgada que rompe la cutícula en la base del apresorio y crece hacia la célula epidérmica de la planta subyacente (Doehlemann *et al.*, 2017).

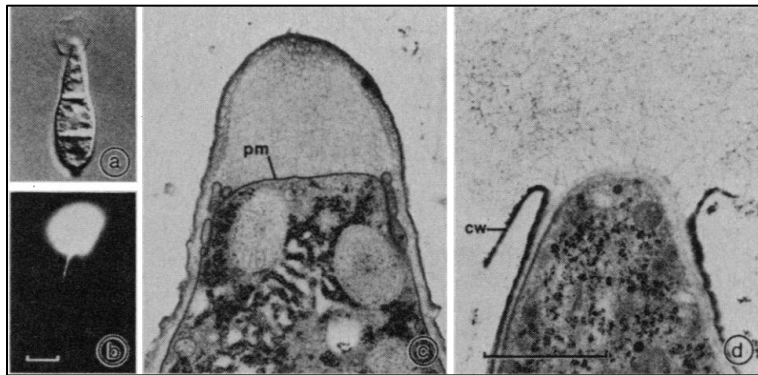


Figura 7. Micrografías de luz (a y b) y electrónicas (c y d) de conidios *M. Grisea* antes (c) y después de (a, b y d) la hidratación. Obtenido de Hamer et al., (1988).

Además de los hongos patógenos que desarrollan apresorios melanizados, existe otro tipo patógenos como *Botrytis cinerea* y *Ustilago maydis* que diferencian una especie de hinchazón o inflamaciones sobre la punta de la hifa de infección o apresorio, que refleja el punto de penetración del hospedador, pero esta estructura no está separada por una pared celular y su pared celular no está fortalecida por melanina, y es probable que la actividad de las enzimas líticas en lugar de una fuerza mecánica facilite la penetración epidérmica de este tipo de estructura de infección (Gourgues et al., 2004; Schirawski et al., 2005; Mendoza et al., 2009).

Por último, se puede hablar de un tercer grupo de hongos fitopatógenos que no desarrollan estructuras para penetrar, en cambio usan las aberturas naturales de sus huéspedes para ingresar, es decir, entran a través de las estomas, para ello, estos hongos han desarrollado patrones de crecimiento direccional en la superficie de la hoja del hospedador para localizar y reconocer las células protectoras de las estomas (Hoch et al., 1987). Es decir que existe un movimiento de los tubos germinativos de los hongos en respuesta a la topografía de la superficie de la hoja, este mecanismo se conoce como tigmotropismo. Una vez que las células germinales del hongo ingresan por las estomas, las clavijas fúngicas se diferencian en hifas invasivas que colonizan rápidamente los tejidos epidérmicos y mesófilos (Hoch et al., 1987).

b) Principales hongos fitopatógenos asociados al cultivo de fresa

En la última década se han registrado distintos hongos que afectan los cultivos de fresa impactando directamente en la producción y rendimientos económicos del cultivo. Consultando la base de datos de la Sociedad Americana de Fitopatología (APS por sus siglas en inglés) se tienen un total de 48 informes desde el año 2015 hasta la fecha de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de fresa alrededor del mundo, entre los principales hongos que tienen mayor incidencia son aquellos que causan pudriciones de distintos tipos al fruto, raíz y a la corona (tabla 1), siendo los hongos con mayor incidencia especies de los géneros *Colletotrichum* y *Botrytis*. Las especies de *Colletotrichum* sp., fueron reportadas como las principales causantes de “Antracnosis” y “Pudrición de la corona”, se encontraron en distintas partes del mundo como Brasil (Soares *et al.*, 2021), Taiwan (Chung *et al.*, 2019), Carolina del Norte en USA (Adhikari *et al.*, 2019), Bangladesh (Gupta *et al.*, 2019) y China (Bi *et al.*, 2017). El otro grupo de hongos que también se reportaron en un alto número de informes son los pertenecientes al género *Botrytis*, todos relacionados a las pudriciones del fruto o mejor conocido como la enfermedad del “moho gris de la frutilla”, que afecta distintas partes del mundo como Kazajstán (Ismagulova *et al.*, 2020), California y Florida en los Estados Unidos (Amiri *et al.*, 2016), (Mansouripour y Holmes, 2020; Cosseboom *et al.*, 2018), Pakistán (Ahmed *et al.*, 2018).

Tabla 1. Principales hongos fitopatógenos de la fresa reportados a nivel global por la APS desde el 2015 hasta la actualidad.

Patógeno	Enfermedad	Lugar	Año
<i>Colletotrichum karstii</i>	A	Brasil	2021
<i>Neopestalotiopsis</i> sp	Mf y Pf	Florida	2021
<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	Th y Pc	Taiwán	2020
<i>Botrytis cinerea</i>	Pf	Kazajstán	2020
<i>Geotrichum candidum</i>	Pf	Estados Unidos	2020
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pf	Florida	2020
<i>Gilbertella persicaria</i>	Pf	Florida	2020
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	Tf	Brasil	2020
<i>Phytophthium helicoides</i>	Pr y Pc	China	2020
<i>Botrytis cinerea</i>	Pf	California	2020
<i>Fusarium oxysporum</i>	Mv	Ecuador	2020
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Pf	California	2020
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	Pr y Pc	Italia	2019

<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	Pr y Pc	Uruguay	2019
<i>Pestalotiopsis</i> sp	Mf y A	México	2019
<i>Phytophthium helicoides</i>	Pc	Américas	2019
<i>Colletotrichum siamense</i>	Pc y A	Taiwán	2019
<i>Colletotrichum siamense</i>	Pc y A	Carolina del Norte	2019
<i>Corynespora cassiicola</i>	Mf	América del norte	2019
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Pr y Pc	Pakistán	2019
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Pf	Estados Unidos	2019
<i>Rhizoctonia</i> sp	Pr	España	2019
<i>Fusarium proliferatum</i>	Mv	España	2019
<i>Colletotrichum siamense</i>	Pc y A	Bangladesh	2019
<i>Rhizoctonia</i> sp	Pr	España	2018
<i>Fusarium oxysporum</i>	Mv	Bangladesh	2018
<i>Corynespora cassiicola</i>	Mf	China	2018
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	Pr y Pc	Argentina	2018
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Pr y Pc	Italia	2018
<i>Nectria pseudotrichia</i>	Pc	China	2018
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Pc	Estados Unidos	2018
<i>Ceratobasidium</i> sp	Pr y Pc	India	2018
<i>Alternaria alternata</i>	Mf	Pakistán	2018
<i>Botrytis mali</i>	Pf	California	2018
<i>Botrytis cinerea</i>	Pf	Pakistán	2018
<i>Monilinia fructicola</i>	Pf	Estados Unidos	2017
<i>Fusarium solani</i>	Pf	Pakistán	2017
<i>Botrytis mali</i>	Pf	Estados Unidos	2017
<i>Colletotrichum truncatum</i>	A	China	2017
<i>Chaetomium globosum</i>	Pr y Pc	Pakistán	2017
<i>Golovinomyces orontii</i>	Mp	China	2017
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Pf	Taiwán	2016
<i>Phytophthora capsici</i>	Pf	mundial	2016
<i>Colletotrichum boninense</i>	A	China	2016
<i>Geotrichum candidum</i>	Pf	Pakistán	2016
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	Pr y Pc	España	2016
<i>Botryotinia ricini</i>	Pf	Estados Unidos	2016
<i>Rhizoctonia</i> sp	Pr	China	2016
<i>Rhizoctonia</i> sp	Pr	China	2015

*Las abreviaciones indican la afección causada por los patógenos fúngicos, siendo A (Antracnosis), Mf (Mancha foliar), Mp (Mildiu polvoroso), Mv (Marchitamiento vascular), Pc (Pudrición de la corona), Pf (Pudrición del fruto), Pr (Pudrición de la raíz) y Th (Tizón de la hoja).

Existen enfermedades poco conocidas, pero tan severas que pueden llegar a afectar distintas partes de la planta (figura 8), como el fruto, cuya calidad puede verse disminuida, impidiendo así, su comercialización, ejemplo de algunos hongos que atacan raramente a los frutos son *Sclerotinia sclerotiorum* (Marin y Peres, 2020), *Gilbertella persicaria* (Zhang et al., 2020), y *Aspergillus tubingensis* (Palmer

et al., 2019). Además, existen otros hongos que pueden afectar raramente las flores y las hojas de las fresas, como es el caso de los hongos *Cladosporium tenuissimum* causante del tizón en flor (Santos et al., 2020), y *Neopestalotiopsis* spp., que pueden atacar de forma agresiva distintas partes de las plantas de fresa como las hojas o frutos (Baggio et al., 2021).

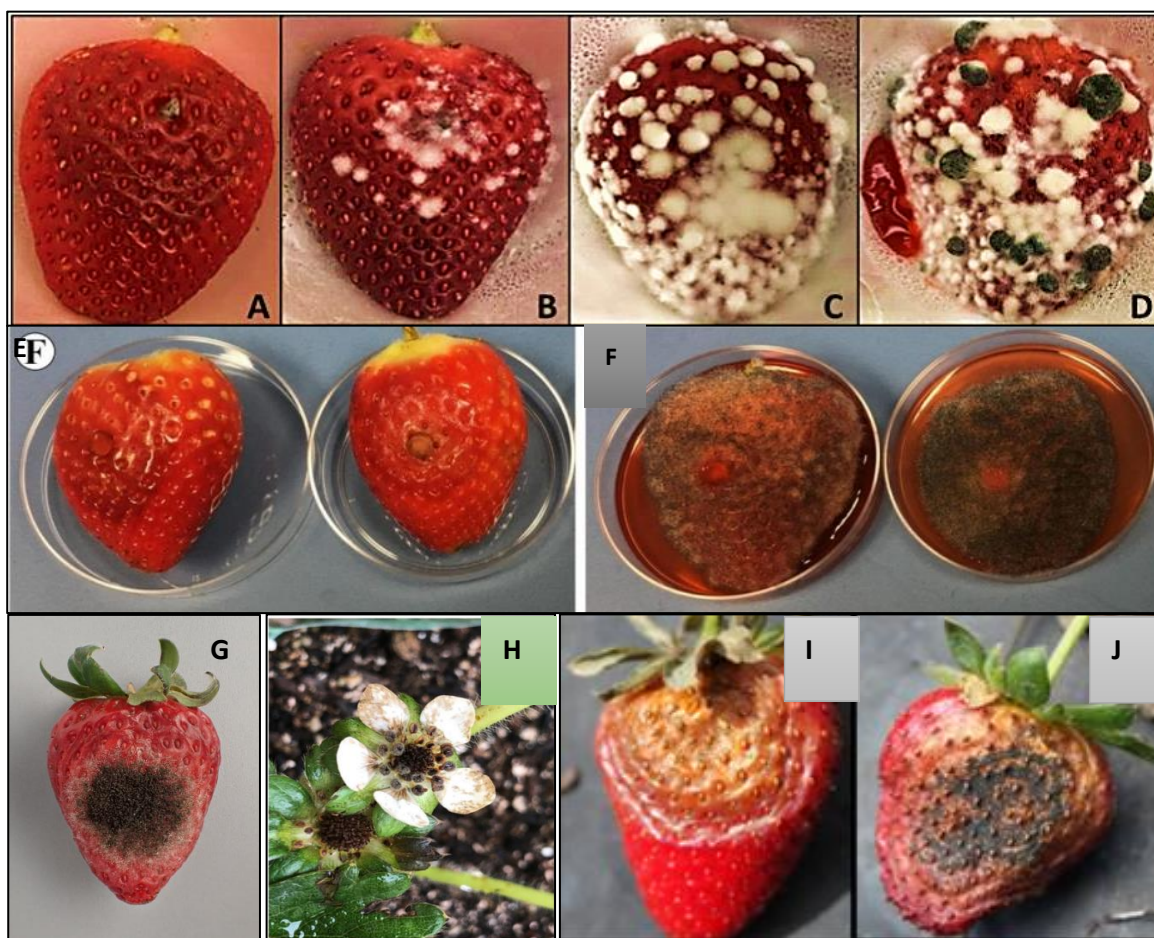


Figura 8. Principales signos de infecciones fúngicas raras en cultivos de fresa. A-D) pudrición del fruto causada por *Sclerotinia sclerotiorum*, E-F) Pudrición del fruto causada por *Gilbertella persicaria*, G) Pudrición del fruto causada por *Aspergillus tubingensis*, H) Tizón de la flor causada por *Cladosporium tenuissimum* causante e I-J) Pudrición del fruto causada por *Neopestalotiopsis* sp.

V. CONTROL DE ENFERMEDADES FÚNGICAS EN EL CULTIVO DE FRESA

La mayoría de los productores de fresa que viven en países en desarrollo como es el caso de México, se basan en sistemas de producción agrícola convencional, debido a que un alto porcentaje son pequeños agricultores, y uno de los principales factores que ocasiona mermas en los cultivos, son las enfermedades fúngicas, ocasionadas por lo general por hongos fitopatógenos transmitidos a través del suelo, por ello, es necesario realizar la correcta desinfestación del suelo con distintas metodologías, pero en la mayoría de casos los productores dependen en gran medida de los agroquímicos (fungicidas) para prevenir y / o controlar estas enfermedades (Ali Anwar, 2018). A pesar de la alta efectividad y facilidad de uso, de los agroquímicos, su uso inadecuado puede provocar problemas como la contaminación atmosférica y un desequilibrio en la comunidad microbiana, desfavoreciendo a los microorganismos benéficos y conduciendo al desarrollo de cepas resistentes de los distintos fitopatógenos fúngicos (Emoghene & Futughe 2016). El control exitoso de las enfermedades depende de la correcta identificación de patógenos, el uso de trasplantes libres de patógenos, el control de hongos y medidas de saneamiento (Ali Anwar, 2018). Estos puntos se pueden cubrir aplicando el enfoque del manejo integrado de plagas y enfermedades (MIP), el cual se consigue con la combinación de técnicas físicas, químicas, biológicas y genéticas, que evalúa a las plagas y enfermedades como sistema (sistema ecológico) y como poblaciones (Jiménez, 2018). Dentro de los métodos de apoyo del MIP se encuentra el uso de agentes de Control Biológico, el cual se basa en los esfuerzos de investigación para identificar los diversos enfoques ecológicos (i) para mitigar los efectos nocivos de la infección por patógenos microbianos de las plantas: oomicetos, hongos, bacterias, fitoplasmas, virus y viroides, mediante el uso de microorganismos antagonistas, materiales de origen natural de origen vegetal y animal y compuestos inorgánicos y orgánicos, (ii) para reducir o reemplazar el uso de químicos sintéticos y (iii) para integrar las estrategias compatibles y sinérgicas para mejorar la efectividad de la supresión de enfermedades (Narayanasamy, 2013). Se espera que a través de estos enfoques se proteja el medio ambiente y posibiliten el aumento de los rendimientos de los cultivos, para suministrar al consumidor productos agrícolas libres de residuos químicos. Es por ello que, en los

últimos años, el control biológico se ha convertido en una alternativa prometedora, más segura y ecológicamente aceptable que el control químico en el manejo de enfermedades transmitidas por el suelo (Shalini y Srivastava, 2008).

a) Hongos como agentes de control biológico

Una de las propuestas más prometedoras para suplir el uso de plaguicidas de síntesis química (fungicidas), es el uso de hongos como fungicidas biológicos para el control de dichas enfermedades vegetales, propuesta que ha atraído la atención de científicos de todo el mundo (Jiang *et al.*, 2019). Específicamente, el uso de hongos antagónicos tiene amplias y significativas perspectivas de desarrollo para establecer una agricultura ecológica respetuosa con el medio ambiente, mejorar la calidad de los productos agrícolas y desarrollar estrategias de agricultura sostenible (Sharma, 2019). Es por ello, que hoy por hoy, el uso de un agente de control biológico fúngico (BCA) se considera un fenómeno natural de rápido desarrollo en el área de investigación con implicaciones para el rendimiento de las plantas y la producción de alimentos, debido a que no causan ningún daño al medio ambiente y, por lo general, no desarrollan resistencia en varios tipos de insectos, plagas, malezas y patógenos debido a su complejo modo de acción (Sharma, 2019).

b) El género *Trichoderma*

Este género lo conforman diversas especies fúngicas cosmopolitas, que colonizan distintos ecosistemas como los suelos agrícolas, debido a que tienen bajo requerimiento nutricional y su crecimiento se promueve en el intervalo de los 25 a 30°C (Sandle, 2014), eso expone su capacidad de adaptación y subraya su importancia como fuente para la producción de metabolitos, como enzimas, compuestos promotores de crecimiento vegetal, y compuestos volátiles, por ejemplo fitohormonas (auxinas y giberelinas) y ácidos orgánicos (glucónico, fumárico, y cítrico) que pueden disminuir el pH del suelo y propiciar la solubilización de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso, los cuales son vitales para el metabolismo vegetal (Torres-De la Cruz *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017). Además, en suelos contaminados con patógenos, no solo mejoran el crecimiento de las plantas, sino

que también inhiben el crecimiento de organismos fitopatógenos, incluidas bacterias, nematodos y especialmente hongos, mediante mecanismos antagonistas (Sood *et al.*, 2020), al inhibir su crecimiento a través de interacciones directas como el micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio y antibiosis (Zhang *et al.*, 2017).

c) Formulados biológicos o bioinoculantes

Los formulados biológicos o bioinoculantes tienen como principal objetivo estabilizar a los microorganismos durante la producción, el almacenamiento y la distribución, con el fin proteger al microorganismo de factores ambientales dañinos y mejorar la actividad del organismo a la hora de su aplicación, además de mejorar su antagonismo contra los patógenos diana (Jones y Burges, 1997). La potencia del producto dependerá de la cepa de microorganismo utilizada, aunque puede haber requisitos físicos y nutricionales perentorios del microorganismo para permanecer activo durante más tiempo (Keswani *et al.*, 2016). Si bien no existe una definición universal para “bioformulación”, se entiende que son preparaciones que contienen microorganismos y agentes que fungen como ayuda para preservar a los microorganismos, entregarlos a sus objetivos y, una vez allí, mejorar su actividad, estas preparaciones pueden ser sustitutos parciales o totales de los productos químicos (Burges y Jones, 1998; Arora *et al.*, 2010). Bajo esta premisa, y para que se cumpla el objetivo principal de un bioinoculante es decir la correcta preservación del organismo se deben considerar la correcta elección de sus componentes, los cuales en su mayoría son un ingrediente activo, materiales portadores y aditivos (Mishra y Arora, 2016). El primer componente es el ingrediente activo el cual puede ser un microorganismo completo y en el caso de los hongos se puede seleccionar diferentes propágulos, como; esporas, micelio y conidios, siendo las esporas los principales ingredientes activos, la selección del mismo debe ser sustentada por evaluaciones experimentales e investigación, con el fin de tener una regulación y prevención de efectos secundarios perjudiciales a la hora de su liberación en un ambiente determinado, además de tener en cuenta que el éxito de la bioformulación dependerá en gran medida de la supervivencia del ingrediente activo en el

bioinoculante final (Auld *et al.* 2003; Hynes y Boyetchko, 2006). El segundo componente es el material portador o vehículo, este debe ser inerte y debe asegurar la carga de células de forma tal que al ser almacenado por distintos periodos de tiempo sufra los menores cambios posibles, algunos portadores más usados son; arcilla fina, turba, vermiculita, alginato y perlas de poliacrilamida, tierra de diatomeas, talco, vermiculita, celulosa (carboximetilcelulosa) y polímeros, especialmente goma de xantano (Digat, 1989). El tercer componente son los aditivos, estos protegen de las duras condiciones ambientales y mejoran las propiedades físicas, químicas y nutricionales de las formulaciones (Schisler *et al.* 2004; Hynes y Boyetchko, 2006). Se puede considerar a un bioinoculante excelente como aquel que se introduce a un ecosistema y, posteriormente, sobrevive, prolifera, se activa y se establece en un nuevo entorno (Khan, 2005).

d) Tipos de presentación de los bioinoculantes

Las propuestas para la aplicación de bioinoculantes son tan variadas, pero buscando la mayor eficiencia de la aplicación en campo y que los productos transporten el máximo número de propágulos del organismo con un volumen mínimo, además de mantener su supervivencia e integridad (Khan y Anwer, 2011). Se han desarrollado diferentes metodologías de inmovilización celular para diseñar sistemas portadores eficaces para producir formulaciones comerciales de bioinoculantes. Principalmente se considera que solo hay 3 tipos de Bioformulados, líquidos, sólidos y encapsulamientos, sin embargo, dentro de estos tipos existe una gran variedad de subtipos (Mishra y Arora, 2016). En los sólidos podemos mencionar subtipos como; gránulos, microgránulos, polvos humectables, gránulos humectables / dispersables en agua, y polvos. Las formulaciones líquidas también se conocen como suspensiones fluidas o acuosas y consisten en suspensiones de biomasa en agua, aceites o combinaciones de ambos (emulsiones) (Schisler *et al.*, 2004) algunos tipos de suspensiones son; concentradas, miscibles en aceite, suspensión de volumen ultra bajo y dispersión de aceite (Mishra y Arora, 2016). El tercer tipo bioinoculantes más nuevos y eficientes son los encapsulamientos de células en perlas poliméricas (Schoebitz-Belchí, 2016), estas perlas pueden ser de

dos tipos; macroesferas o microesferas, las cuales difieren de acuerdo a su tamaño, los macroencapsulados producen perlas de tamaños desde unos pocos milímetros hasta centímetros, en contraste con los microencapsulados que producen perlas de tamaños desde 1 hasta 1000 μm (Nordstierna *et al.*, 2010). La encapsulación se discute más adelante en el marco teórico, destacando las investigaciones más recientes sobre el encapsulamiento de especies del género *Trichoderma* y su aplicación como biotecnología agrícola.

VI. GENERALIDADES DE LA ENCAPSULACIÓN

Las formulaciones de bioinoculantes se presiden bajo un principio fundamental, y concertando con Kim *et al.* (2021), “la protección de los microorganismos y la liberación gradual y prolongada en el sitio de acción” es el principio fundamental a la hora de formular un bioinoculante. Otro elemento importante a la hora de trabajar con encapsulados o usar matrices poliméricas para la inmovilización de células, es, la tasa de degradación de dicha matriz, ya que de eso depende la protección de las células y esto va definir de manera crítica la supervivencia del agente de control biológico (Schoebitz-Belchí, 2016). En algunos casos las capsulas se someten a procesos de deshidratación para ahorrar volumen y evitar la salida y entrada de materiales al interior de la capsula, en esta etapa muchas células mueren, para solucionar este problema se ha propuesto incorporar materiales de relleno y además nutrientes esenciales transformando las capsulas en micro-biorreactores, adonde la actividad biológica de las células no se ve limitada ni detenida (Wu *et al.*, 2012). Otro aspecto interesante es que se recomienda usar un ACB que produzca esporas. El alginato de sodio es el material más utilizado para la encapsulación de células, enzimas y agentes de control biológico, debido a su simplicidad de manejo, viscosidad y propiedades de mejora del gel haciendo caso a las sugerencias mencionadas anteriormente para preservar la viabilidad de las celulas (Bashan *et al.*, 2014).

a) Encapsulación por pulverización

El secado por atomización es una técnica bien conocida de producción de partículas que comprende la transformación de un material fluido en partículas secas, aprovechando un medio de secado caliente gaseoso. A través de este proceso se consigue la elaboración de microcápsulas, para ello, los materiales pasan por 3 etapas diferentes durante el proceso de secado; la atomización, la conversión de gota a partícula y la recolección de partículas (Santos *et al.*, 2018). La primera etapa consiste en bombear una solución a un atomizador para conseguir una lluvia de gotitas finas. Posteriormente, las gotitas se expulsan a una cámara de gas de secado donde ocurre la vaporización de la humedad, lo que resulta en la deshidratación y formación de partículas secas. Por último, las partículas secas se separan del medio de secado, luego se recogen en un tanque (Santos *et al.*, 2018). Si bien es un método fácil y rápido debido a que funciona de manera continua, bajos costos operativos, alta calidad de cápsulas con buen rendimiento, rápida solubilidad de las cápsulas, cápsulas de tamaño pequeño y alta estabilidad. Sin embargo, tiene ciertas desventajas, la más desalentadora es el impacto perjudicial sobre la integridad celular de los microorganismos durante el secado y la reducción resultante en la supervivencia de las células inmovilizadas (Campos *et al.*, 2014), además de presentar baja uniformidad del tamaño de las microcápsulas, las limitaciones en la selección del material de la pared y la alta temperatura requerida en el proceso, que puede no ser adecuada para encapsular propágulos biológicos.

b) Encapsulación por lecho fluidizado

El secado de lecho fluidizado se emplea para evaporar los volátiles residuales de un material en polvo para obtener el contenido de humedad requerido. La energía se aplica al producto en polvo en forma de aire caliente dirigido a través de una placa perforada que hace que las partículas de polvo se fluidicen. Por lo regular, se obtienen gránulos y aglomerados con un tamaño de partícula entre 70 micrones y 2 mm. Esta técnica de lecho fluido implica el secado, enfriamiento o recubrimiento de materiales particulados para una amplia gama de productos sensibles al calor (Schoebitz y Belchí, 2016). La aplicación de esta técnica ofrece ventajas, como;

mayor especificidad en la distribución del tamaño de partícula y producir porosidades bajas de los gránulos, altas tasas de secado, menor área de flujo, alta eficiencia térmica y operación simple, con menores costos de capital y mantenimiento. Además, se considera menos estresante para secar células fúngicas en comparación con el secado por aspersión (Morgan *et al.*, 2006).

c) Coacervación

La coacervación es un método fisicoquímico de separación de fases en el cual el soluto polimérico separado en pequeñas gotas constituye el coacervado y la otra fase sin polímero es llamada solución de equilibrio (Reyna *et al.*, 2015). La coacervación es usada ampliamente para la gelificación reversible y microencapsulación de material biológico. Comúnmente, el núcleo es de un material compatible con el polímero, pero insoluble en el medio de coacervación. Hay dos tipos de coacervación, simple o compleja. En la coacervación simple solo existe un polímero, mientras que en la compleja interactúan dos coloides cargados opuestamente (Ke Gang *et al.*, 2005). Las microcápsulas finales se consiguen por gelificación de las cápsulas formadas cuando el coacervado se deposita alrededor de partículas insolubles dispersas en un líquido. Las principales limitaciones de este método son; la evaporación, la disolución del compuesto activo en el disolvente de procesamiento y la oxidación del producto (Flores *et al.*, 1992). Por ende, el método de coacervación es eficaz pero caro y tiene ciertas limitaciones.

d) Gelificación iónica

La gelificación iónica es una de las técnicas más sencillas y económicas para producir microcápsulas, ya que no requiere altas temperaturas ni disolventes; por tanto, es especialmente útil para ingredientes activos sensibles al calor (Naranjo *et al.*, 2021). Existen dos tipos principales de gelificación iónica; gelificación externa y gelificación interna. En la primera, una solución de alginato de sodio que contiene el ingrediente activo se extruye en una solución de cloruro de calcio, y la cápsula se forma cuando los iones Ca^{2+} se difunden desde la solución salina hacia el polímero (Ortiz *et al.*, 2021). En cambio, la gelificación interna ocurre cuando una solución

que contiene alginato, ingrediente activo y CaCO_3 se extruye en un medio de aceite acidificado (Rajmohan y Bellmer, 2019). La reacción comienza cuando los iones Ca^{2+} se solubilizan en el medio acidificado, reaccionan con el alginato a través de interacciones iónicas y forman hidrogeles, que atrapan el material de interés.

VII. ENCAPSULAMIENTO DE *Trichoderma* SP.

En los últimos años, el desarrollo de Bioformulados a base de *Trichoderma* spp., ha surgido como una alternativa al uso de fungicidas en campo y sustitutos totales, parciales o en combinación con fertilizantes químicos, principalmente por el éxito que tienen estos hongos como agentes de control biológico de enfermedades y por sus características de promoción del crecimiento vegetal (Vinale *et al.*, 2008). Regularmente los bioformulados tienen éxito en condiciones *in vitro* y muestran dificultades al aplicarlos sobre los cultivos en huertos, donde su éxito se ve afectado (Mishra & Arora, 2016). El escaso éxito en campo se debe especialmente al mantenimiento de la viabilidad celular en el material portador, esto debido a que se usan esporas vivas que normalmente se propagan en condiciones controladas de laboratorio (Vemmer & Patel, 2013). Para resolver esta problemática se ha propuesto la inmovilización de celular como posible alternativa para aumentar la viabilidad de esporas en un material portador, además de mantener características deseables como la biocompatibilidad, biodegradabilidad y protección a factores abióticos como la irradiación UV, humedad relativa, salinidad en suelos agrícolas, entre otros (Fraceto *et al.*, 2018).

Existen diversos estudios que brindan información sobre la caracterización de las biopartículas (Locatelli *et al.*, 2018), la viabilidad celular, la actividad biológica y enzimática (Mancera-López *et al.*, 2019). Si bien la caracterización de los encapsulados puede variar respecto al enfoque de la investigación, existe un tema fundamental en la mayoría de los trabajos de encapsulamiento celular, y es la determinación del tamaño y forma de las biopartículas, autores como Maruyama *et al.* (2020) o el equipo de Lopes *et al.* (2020) mencionan metodologías sencillas y de bajo costo como el análisis de microfotografías de las biopartículas observadas

desde un estereoscopio junto a una escala de medición, para el análisis ambos equipos usaron el software ImageJ (Image J1.47v Wayne Rasband, NIH, USA). Para complementar la caracterización morfológica de las biopartículas se puede hacer uso de la microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) estas últimas para dilucidar el aspecto interno o de la superficie de las biopartículas y la interacción entre el hongo y los componentes de la bioperla (Jurić *et al.*, 2019).

Otro factor igualmente estudiado es la viabilidad celular en el interior de las bioperlas durante su almacenamiento o después de haber sido sometidas a distintos tipos de estrés abiótico como la radiación UV, PH, y temperatura entre otros. Por lo general, el análisis de la viabilidad celular se hace a partir del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) como principal variable cuantitativa para comparar el efecto directo entre las esporas y la matriz de encapsulamiento después de haber sufrido algún tipo de estrés abiótico, ejemplo de ello se refleja en el trabajo de Lopes *et al.*, (2020) en el cual publican una disminución en la concentración de células viables (UFC/g) de *Trichoderma asperellum* después de la encapsulación en perlas intactas y liofilizadas a diferentes temperaturas de almacenamiento durante 120 días. Otro ejemplo donde se aprecia un comportamiento similar es en el trabajo de Maruyama *et al.*, (2020) donde la cuantificación de esporas de *T. harzianum* encapsuladas en las micropartículas de alginato de calcio húmedo y seco, disminuye durante el almacenamiento de 90 días a 5 y 30°C.

Por último, la actividad biológica se atribuye principalmente a la capacidad antagonista o de biocontrol ejercido por el agente encapsulado sobre algún patógeno objetivo, en la investigación de Guilger *et al.*, (2017) discuten acerca del potencial de las nanopartículas de plata biogénicas de *T. harzianum* como posibles herramientas de biocontrol por ejercer un efecto de antagonismo sobre el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, responsable de la enfermedad del moho blanco en diversos cultivos agrícolas de interés.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema principal es el manejo de enfermedades fúngicas con fungicidas químicos, el cual urge se sustituya gradualmente por alternativas más sostenibles como el control biológico, para esto es necesario el uso de bioinoculantes microbianos eficientes, que superen ciertas dificultades y limitaciones a la hora de su aplicación en campo.

Antes de desglosar las problemáticas a solucionar, se debe mencionar que todas están relacionadas y arraigadas a la metodología de producción de fresa en suelo. En primer lugar, la desinfestación de los suelos destinados a la producción de fresa por lo general en el sistema convencional y por experiencia propia he visto que es infravalorada o no se lleva a cabo, por consecuente muchas enfermedades fúngicas transmitidas por el suelo se expresan a la hora de hacer trasplantes de fresa, enseguida cabe mencionar que la mayoría de los trasplantes son a partir de clones, es decir que provienen de la multiplicación de individuos a partir de estolones y por consecuente esto facilita la infección en toda la población de plantas. Otra actividad que genera problemas fitosanitarios es el manejo de las enfermedades que se expresan en el agroecosistema, por lo general la aplicación inadecuada de pesticidas solo funciona de manera instantánea y posteriormente se necesita rotación de productos o la eliminación del cultivo. Si bien el control biológico parece ser la alternativa más factible según lo visto experimentalmente por muchos investigadores, la realidad es que en zonas rurales esto es un tema sombrío para muchos productores, ya sea por malas experiencias o desconocimiento del tema. Las malas experiencias se deben a que han intentado hacer uso de los bioproductos que pertenecen a un sistema de control biológico y estos no funcionan como se esperaba que lo hicieran, esta limitación recae en varios puntos, sin embargo, la principal razón es que la mayoría de bioproductos que se aplican tienen una baja tasa de efectividad en campo, la cual se debe a su formulación o a que son productos sin certificación y baratos, en contra parte los bioproductos que tienen un alta tasa de efectividad son equivalente o más caros que los pesticidas que se aplican para el control de enfermedades, por esa razón no se compran en zonas rurales. Por ende, la tarea y parte de la solución del problema es encontrar cepas

antagónicas con un alto porcentaje de biocontrol de diversos fitopatógenos y probar distintas formulaciones que aseguren una alta efectividad en campo y una vida útil más prolongada. Esto sin olvidar el enfoque de sistemas ambientalmente sostenibles. Además, se requieren mayores esfuerzos de investigación para desarrollar tecnologías y métodos para la aplicación de bioinoculantes.

4. JUSTIFICACIÓN

Las razones por las que se debe de realizar innovaciones en los bio-productos aplicados a la agricultura sostenible son obvias, en primera instancia se presenta dar una alternativa al uso de agrotóxicos, que por sí mismos han causado una infinidad de efectos negativos al ambiente y a la sociedad, segunda y considerando a los BCA como la opción más pertinente para el manejo de enfermedades y la promoción del desarrollo vegetal en los distintos cultivos, se tiene sin duda que seguir avanzando en este campo, ya que las formulaciones actuales son muy pocas y su acceso esta reducido a pequeños sectores como productores privilegiados con el conocimiento y economía necesarios para obtener estos productos que en la mayoría están protegidos por el registro de una patente, esto hace un parte aguas ya que no todos los productores tienen acceso o conocimiento de estas alternativas, y más aún en un país en desarrollo se sabe que este campo de la agricultura sostenible se tiene aún en un entendimiento un tanto difuso por la mayoría de la sociedad, por ello la educación de los agricultores es en sí tarea de aquellos que hacen investigación. El uso de BCA en bio-formulaciones es una alternativa que ofrece demasiado, pero falta difusión e investigación, y así es como planteo que con este trabajo los principales beneficiados sean aquellos productores que aún no tienen conocimiento de estas alternativas y el fin es meramente apoyar a estas personas sin ningún interés de por medio, el cultivo a trabajar es la fresa, debido a que, el estado de Puebla ha comenzado a introducirse en el mercado a nivel nacional desde el 2012, además de que la fresa se le considera que es el fruto que permite mostrar al mundo la delicia de la producción mexicana.

5. HIPÓTESIS

- Los encapsulados enriquecidos potenciarán la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma sp.*, frente a los fitopatógenos.
- Los postulados de Koch se cumplirán para al menos un hongo asociado al cultivo de fresa.
- Los encapsulados protegerán la viabilidad de los conidios frente a la radiación UV

6. OBJETIVOS

VIII. GENERAL

- ☒ Cuantificar el PICM (Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial) de los conidios libres y encapsulados frente a los hongos identificados del cultivo

IX.ESPECÍFICOS

- ☒ Identificar las especies de los hongos aislados (asociados o fitopatógenos) del cultivo.
- ☒ Analizar filogenéticamente las secuencias de ADN de los hongos aislados.
- ☒ Caracterizar físicamente los encapsulados mediante microscopía óptica.
- ☒ Realizar los postulados de Koch´ con los hongos identificados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

I. ZONA DE MUESTREO

A principios de febrero del 2020 se visitaron 2 parcelas de producción de fresa, las cuales producen bajo la influencia de la agricultura convencional, una se encuentra protegida en un invernadero de plástico y la otra al aire libre. El área de producción cubre un total de 1000 m². Los cultivos se ubican en la comunidad de Analco de Ponciano Arriaga (Sta. Cruz Analco) que pertenece al Municipio San Salvador el Verde del Estado de Puebla México con sus respectivas coordenadas GPS: Longitud (dec): -98.500278, Latitud (dec): 19.264444. La toma de muestras de tejido vegetativo se realizó en base a los manuales de “Toma, manejo y envío de muestras” de la Dirección General de Sanidad Vegetal del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (SENASICA). Por ello se hace hincapié en que la recolección fue meramente de tejidos con presencia de signos y síntomas frecuentes en el cultivo afectado, siendo estos; frutos, trifolios, tallos y raíces (figura 9).

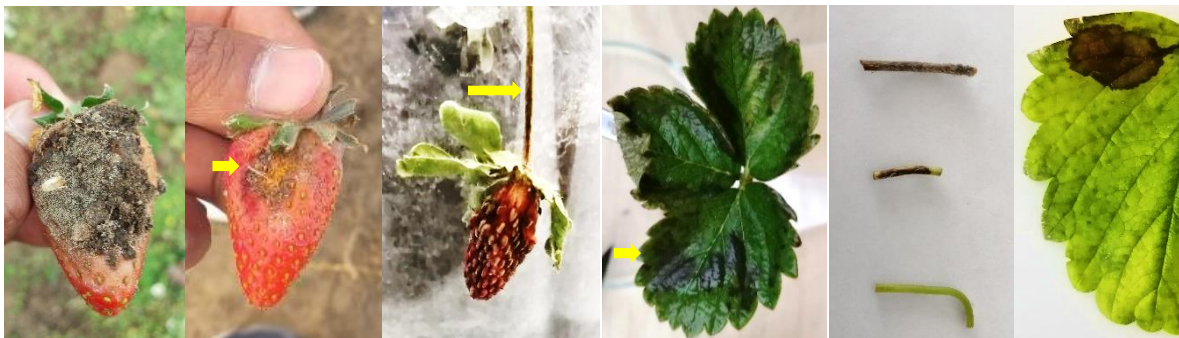


Figura 9. Principales signos y síntomas observados en campo.

a) Aislamiento y purificación

Para el aislamiento de los hongos a partir de tejido vegetativo con síntomas, se adaptaron los pasos descritos en el protocolo para el aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) razas 1, 2 y 3. La tabla 2 describe de forma general el aislamiento de las cepas fúngicas a partir de los tejidos y órganos de fresa.

Tabla 2. Aislamiento y purificación de las colonias en condiciones <i>in vitro</i>
1) Bajo condiciones de asepsia, obtener fragmentos de tejido vegetal sano y enfermo (raíces, corona y tallo). Desinfectar el material de corte entre muestra y muestra. 2) Desinfestar los fragmentos vegetales con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min. Posteriormente, realizar 3 lavados de 2 min cada uno con agua destilada estéril. Colocar los fragmentos en papel absorbente previamente esterilizado por aproximadamente 2 a 3 horas para permitir el correcto secado de los tejidos. 3) Colocar de 6 a 8 fragmentos de material vegetal seco, insertados dentro de cajas Petri con medio de cultivo PDA. Incubar a 25 ± 3 °C durante 5 días. 4) Buscar estructuras del hongo mediante la observación con un microscopio estereoscópico, realizar montajes para visualizar las características (Anexo 8.3) y obtener aislamientos puros en medio de cultivo PDA. 5) Incubar los aislamientos puros a 25 °C durante 8 días. Al término de este tiempo, observar el tipo de crecimiento, coloración del micelio y del medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo. 6) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con las características morfométricas que presenten.

II. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA

b) Tasa de crecimiento micelial

Para caracterizar a los hongos se calculó la TCM (Tasa de crecimiento micelial) con la fórmula propuesta por Arenas, O. R *et al.* (2018). Se registro el crecimiento (radio en cm) de los aislados cada 24 horas, se tomaron 2 puntos de la curva de desarrollo micelial para usarlos en la formula. El experimento se repitió 3 veces para cada aislado, los resultados se sometieron a un análisis de varianza

(ANOVA) de una vía para encontrar variabilidad entre las medias de la TCM presentadas por el total de aislados fúngicos.

Formula:
$$TCM = \frac{RCf - RCi}{T}$$

-Donde: **RCf** es el radio final en cm, **RCi** es el radio inicial en cm y **T** es el tiempo de incubación en días.

c) Morfología macro y microscópica

La caracterización macroscópica de las colonias, se apoyó en las variables de; Textura, Densidad, Tasa de Crecimiento Micelial, Color, y presencia de estructuras de reproducción (esclerocios, cuerpos fructíferos, conidiomas etc). La caracterización microscópica se apoyó de la visualización de estructuras microscópicas (esporas, conidios o hifas) con ayuda de un microscopio óptico Revelation III LW Scientific con una regla micrométrica adaptada en el ocular derecho para medir longitudes de las estructuras. Se registro una n=50 para cada estructura, posteriormente se procesaron las imágenes con el software ImageJ para sacar promedio de sus tamaños.

d) Identificación molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se hizo a partir de 50-100 mg de células fúngicas provenientes de cultivos puros. Se siguió el protocolo establecido por el fabricante del kit E.Z.N.A.® Plant DNA DS Kit. La concentración y calidad del ADN precipitado fue determinada por electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con gel red y por espectrofotometría en un Nanodrop 2.000 C (Termo Scientific, MA, EE. UU.).

Amplificación

Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron fragmentos de las regiones pertenecientes al Espaciador transcrito interno (ITS) y al gen del Factor de elongación de la traducción (TEF1-α). Se utilizaron los

cebadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), EF1-a (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') y EF2-a (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (O'Donnell *et al.*, 1998) respectivamente. La (PCR) se realizó en un Eppendorf Mastercycler Gradient usando 50 ng de ADN genómico, cada mezcla de reacción contenía 50 ng de ADN molde en 3 µL, 1.25 µL de cada cebador (20 mM), 0.2 µL de ADN polimerasa Taq (5 µL⁻¹), 2.5 µL de tampón de PCR 10x, 1 µL de MgCh (50 mM) y 0,25 µL de dNTP (100 mM) suministrados por el fabricante (Ecogen, Barcelona, España) hasta un volumen total de 25 µL. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente para la secuencia TEF 1α: desnaturalización a 94 °C por 85 s, 35 ciclos de 35 s a 95 °C para la desnaturalización, 55s a 58 °C para la hibridación, 2 min a 72 °C para la extensión y finalmente un paso de extensión final de 10 min a 72 °C (Molnár *et al.*, 2015; Mirete *et al.*, 2004). Para la amplificación de las regiones ITS 4/5 el programa fue: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 s, hibridación a 50 °C durante 60 s, extensión de 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C (ADNr de ITS) (Liu *et al.*, 2007). Finalmente, los productos de la PCR se limpiaron con el kit Gene elute pcr cleanup kit de Sigma-Aldrich.

Secuenciación

Las hebras se secuenciaron con el kit de secuenciación de ciclos BigDyeTM Terminator v3.1 (Applied BiosystemsTM) en un Secuenciador analizador genético 3130 (Applied BiosystemsTM) ubicado en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, México.

e) Análisis de secuencias y Filogenia

Los análisis filogenéticos se realizaron con la alineación de secuencias ITS para los hongos *A. aereus*, *B. cinerea* y *N. dictyophora*, y secuencias concatenadas de las regiones ITS-TEF-1α para las 2 especies de *Fusarium* sp., utilizando el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2016), obtenida sde la base de datos GenBankTM (Tabla 3). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima

Verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (1993). Los árboles filogenéticos se obtuvieron mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y luego seleccionando la topología con valor de verosimilitud superior.

Tabla 3. Secuencias del Gen-bank empleadas para corroborar la identidad de los hongos aislados.

Especie	Cepa	Fuente de aislamiento	País	Número de acceso Genebank		Nucleótidos analizados
				ITS	TEF_1α	
<i>Arcopilus aereus</i>	MA_Aa20(C7A)	Fresa	México	MW318995.1	-	658
	TRPH-22-1	Sofo ra vietnamita	China	HQ607894.1	-	
	Sin etiqueta	Liquen	China	KP204385.1	-	
	ATT218	Nido de hormiga	Brasil	HQ607894.1	-	
	Sin etiqueta	Pino	Suecia	KF156298.1	-	
	CBS140.35	Desconocido	Holanda	MH855608.1	-	
	KNUEP5	Cerezo de flor japonés	Corea del sur	MW237705.1	-	
	SRP	Desconocido	India	KF245432.1	-	
	CBS538.73	Estiércol	China	KX976583.1	-	
	KRP28-1	Pino	Suecia	HM036587.1	-	
	CBS538.73	Desconocido	Holanda	MH860768.1	-	
	G4	Securinega	China	MH383165.1	-	
	5476	Orquídea	China	JQ846057.1	-	
	MJ2-2b	Planta “falso starwort”	China	MW255971.1	-	
	MI602	Suelo	Alemania	MW269295.1	-	
	MA-Bc20(c7)	Fresa	México	OM473288.1	-	
	QS-1	Ginseng coreano	China	MN589850.1	-	
	31665	Mariguana	Estados Unidos	MN853683.1	-	
	HZHMN09	Polifila de París	China	MN744695.1	-	
	8	Frambueso	Polonia	MT573470.1	-	
	bc49Nainital	Garbanzo	India	MT250963.1	-	

<i>Botrytis cinerea</i>	Sin etiqueta	Zarzamora	México	MK558826.1	-	744
	18-053	Albahaca	Corea	LC519322.1	-	
	SQ01-501	Planta “curalotodo”	China	MN380285.1	-	
	COAD2922	Albahaca	Brasil	MT089934.1	-	
	KAB-14	Desconocido	Turquía	MT150132.1	-	
	RHS11_IZB29	Colza	República checa	MN275886.1	-	
	SJH-2	Ginseng coreano	China	MN589849.1	-	
	JA-6	Desconocido	China	MN589847.1	-	
<i>Neurospora dictyophora</i>	MA_Nd20(cb9)	Fresa	México	MW520112.1	-	503
	FC-3662	haya japonesa	Japón	LC206595.1	-	
	CBS 656.70	Colección	Holanda	MH859888.1	-	
	CBS 665.74	Colección	Holanda	MH860885.1	-	
	CBS 529.95	Colección	Estados Unidos	MH862539.1	-	
	CBS 275.50	Colección	Holanda	MH856623.1	-	
	CCTU A145	Encino	Alemania	MK886745.1	-	
	CBS 529.95	Colección	Holanda	MH862539.1	-	
	WH92	Zarzamora	Estados Unidos	MN718948.1	-	
	FGSC7221	Desconocido	Suecia	HF976499.1	-	
	KoRLI047144	Liquen	República de Corea	MN341354.1	-	
	CBS 592.69	Colección	Holanda	MH859381.1	-	
	KoRLI047142	Liquen	República de Corea	MN341355.1	-	
<i>Fusarium oxysporum</i>	MA_FC20	Fresa	México	OM473290.1	-	404
	S1B	Jengibre	India	MK209111.1	KP964868.1	
	ATCC 52557	Colección	Estados Unidos	GU256752.1	LC311873.1	
	F90-Kr1t1	Limón	Túnez	KC304815.1	KF574861.1	
	Foc129	Desconocido	India	JN400695.1	JN231156.1	
	HuN4	Desconocido	China	MF445458.1	MF445534.1	
	H31	Desconocido	China	KU939042.1	KU938994.1	
	CPC 27701	Cítricos	Holanda	LT746252.1	LT746204.1	
	F123	Pasto	Kenia	MW995714.1	KP267365.1	
	H49	Desconocido	China	KU939043.1	KU938995.1	
	MA_FC120	Fresa	México	OM473287.1	OM616884.1	869

<i>Fusarium solani</i>	MRC 2635	Desconocido	India	MH582403.1	MH582423.1
	MRC 2805	Desconocido	India	MH582404.1	MH582424.1
	MS	Fresa	España	MH300452.1	MH300523.1
	MY	Fresa	España	MH300482.1	MH300517.1
	MJ	Fresa	España	MH300474.1	MH300509.1
	CB244	Ginseng	China	MN637861.1	MN650097.1
	GuangX17	Desconocido	China	KY785014.1	KY785024.1
	SVY-402-1	Chícharo	Estados Unidos	KJ437436.1	KM044428.1

III. EVALUACIÓN DE LOS POSTULADOS DE KOCH

f) Ensayos sobre trifolios en cámaras húmedas

Se uso un total de 10 trifolios sanos para la inoculación del agente candidato a fitopatógeno foliar. Donde 8 ensayos se pusieron en contacto con el hongo y 2 sin contacto, estos últimos sirvieron de control negativo. Cada cámara estuvo compuesta por un frasco de vidrio de 100 ml con algodón en su interior suficiente para mantener un ambiente de humedad, cubiertos por aluminio y asegurados con una liga, a su vez todo el sistema de cámara humedad se guardó en una bolsa ziploc para evitar la entrada de partículas de polvo (figura 10).



Figura 10. Prototipo de cámara húmeda usada en los ensayos.

La cámara húmeda se esterilizó previamente a 120 °C por 20 minutos en autoclave. Para la inoculación del hongo se adoptó parte del protocolo de “Diagnóstico de *Septoria lycopersici*” causante de la Mancha foliar o *Septoriosis* del tomate (SENASICA, 2019), tomando en cuenta la sección de “incubación en papel secante”. Se modificó parte del material para el armado de la cámara húmeda, por

cuestiones de falta de material y contingencia. Se sustituyeron las placas de Petri por frascos, y el papel absorbente por algodón estéril. Se colocó un trifolio por frasco, los cuales se les practicó una herida en cada hoja con una aguja de insulina estéril, posteriormente se inoculó una gota con esporas del hongo en la herida foliar localizada y se incubó a 25 °C, bajo condiciones de humedad (90 %), durante 7 días. Se observó por 15 días la aparición de signos o síntomas provocados por el hongo, en caso de ver signos o síntomas se procedió al aislamiento en medios de cultivo PDA y verificar mediante microscopia la presencia del mismo agente fúngico. El experimento se hizo por duplicado.

g) Ensayos sobre frutos en placas de Petri

En las pruebas realizadas sobre frutos se usaron un total de 5 frutillas maduras y sanas, donde 4 se pusieron en contacto con el hongo a evaluar y 1 sin contacto, esta última fungió como control negativo, los experimentos se realizaron por duplicado. Las pruebas se basaron en las metodologías descritas por Zhang *et al.* (2020) y Marin y Peres (2020). Las fresas se sometieron a desinfección superficial con cloro al 0.05% durante 3 min, posteriormente se enjuagaron con agua bidestilada estéril y finalmente se secaron a 25 °C bajo luz UVc durante 15 min. Se ejerció una herida mecánica (2 × 2 × 2 mm) en los frutos con una punta micológica de acero previamente esterilizada, posteriormente se le colocaron 10 µL de suspensión de esporas (1 × 10⁶ esporas / mL). Se inoculó agua esterilizada en 2 frutillas que sirvieron de control negativo. Finalmente, las fresas inoculadas se colocaron sobre placas de Petri de 5 cm de diámetro con medio PDA para descartar el crecimiento de algún otro hongo o agente invasivo durante el experimento y corroborar el desarrollo del hongo inoculado (figura 11). Las cámaras se incubaron a temperatura ambiente por 7 días en condiciones de oscuridad.

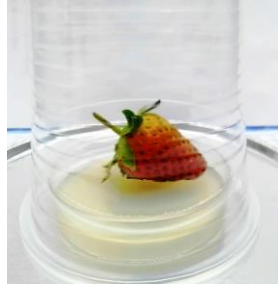


Figura 11. Ensayos de patogenicidad sobre frutos de fresa

h) Ensayos sobre plantas adultas en maceta

En las pruebas hechas en plantas de fresa (*Fragaria × ananassa*) variedad Camino Real de un año de edad, se adaptó la metodología propuesta por Forero Reyes *et al.*, (2018). Se evaluó la cepa de *Fusarium solani* MA-Fc1, para eso se usó un total de 12 plantas donde 10 se pusieron en contacto con el agente fúngico y 2 sin contacto, estas últimas sirvieron de control absoluto y control abiótico. El experimento se hizo por duplicado. Se preparó el inóculo fúngico en 350 ml (figura 12 A y B) de medio para la producción de conidios (azúcar pulverizada, 10 g/l; levadura panaria, 5 g/l). Se incubó a 30°C con agitación constante (120 rpm) durante 72 h y se ajustó la concentración a 1×10^7 conidios/ml. Se comenzó con una desinfección general, se removió toda la tierra de las raíces practicando enjuagues con agua corriente, se desinfestaron las raíces con una solución de hipoclorito al 10 % en una tinaja practicando movimientos circulares para embeber todas las raíces (figura 12 C y D). Posteriormente se enjuaga con agua estéril y con ayuda de un atomizador se aplicó peróxido de hidrógeno en toda el área de las raíces. Finalmente se lavaron con agua estéril y con ayuda de un bisturí del número 10 se practicaron heridas aleatorias en los ápices de las raíces (cortes de 5 mm) y se infectaron mediante inmersión en 20 ml del inóculo durante 5 min (figura 12 E y F). Al control abiótico también se le practicaron heridas en las raíces, pero se sumergió en una solución salina estéril (0,85%), y el control absoluto consistió en una planta sin lesiones (Figura 12 G). Todas las plantas fueron luego trasplantadas a una mezcla de sustrato previamente esterilizado compuesto de tierra de bosque: composta: agrolita 2:1:1, con aplicación de riego cada 2 días (figura 13).



Figura 12. Metodología ilustrativa de los ensayos de inoculación del patógeno en plantas de fresa sobre maceta.



Figura 13. Plantas inoculadas puestas condiciones de invernadero.

Las plantas se mantuvieron bajo observación en condiciones de invernadero por un periodo de tiempo de 30 a 45 días, con evaluación cada semana para determinar la eventual aparición de síntomas típicos de marchitamiento vascular (clorosis, pérdida de turgencia, epinastia y defoliación). Para aislar nuevamente el patógeno, estos materiales fueron sembrados en medio agar papa dextrosa e incubados a 30

°C. La observación se realizó a los 5 días de incubación, evaluando características macro y microscópicas.

i) Ensayos sobre plántulas germinadas

Germinación, trasplante e infección

La germinación de plántulas se hizo a partir de frutos maduros y frescos. Primero se finalizó el proceso de dormancia de las semillas mediante la estratificación de los frutos, esto se consiguió con temperaturas de 4 °C por un periodo de 72 a 100 h. Posteriormente, se desinfectaron los frutos mediante lavados alternados entre agua estéril y una solución de hipoclorito al 10 %. Posteriormente se extrajeron las semillas, para ello se realizaron cortes superficiales de aproximadamente 3 mm de grosor por toda la periferia del fruto, el objetivo fue quitar la capa final del aquenio donde están incrustadas las semillas, al final se obtuvieron pedazos irregulares con un número variable de semillas incrustadas, estos pedazos se sometieron a deshidratación bajo luz solar durante 4 a 5 días, después de la deshidratación se extrajeron las semillas con ayuda de un cotonete estéril, las semillas se desprendieron fácilmente, esto se consiguió por la correcta deshidratación de la piel del aquenio. Las semillas recolectadas se desinfectaron en breve y se cubrieron con una toalla estéril húmeda de papel humectable, se resguardaron al interior de una bolsa estéril con sellable por un periodo de 30 a 45 días hasta observar los primeros brotes (figura 14 A). Durante la incubación se revisó que no existiera presencia de mohos sobre las semillas o la servilleta para descartar contaminación ajena. Las pruebas de infección se realizaron con 15 plántulas de 15 días de germinación y se trasplantaron a recipientes con sustrato previamente esterilizado, conformado por compost, perlita y suelo agrícola en proporciones de 2:1 respectivamente, se dejó crecer las plántulas trasplantadas por un periodo de 20 días cuidando su riego constante (figura 14 B) para evitar la muerte por sequía. Posteriormente las plántulas se extrajeron y se revisaron sus raíces para descartar signos de infección por hongos (figura 14 C y D).

La infección de las raíces se hizo según la metodología de Forero Reyes *et al.*,⁷ (2018). Los ensayos se observaron por un periodo de 15 a 20 días, con evaluación diaria para determinar la eventual aparición de síntomas típicos de marchitamiento vascular (clorosis, pérdida de turgencia, epinastia y defoliación) y establecer la severidad de la enfermedad calculando el porcentaje de mortalidad y usando la escala propuesta por Forero *et al.*, (2015). Para aislar nuevamente el patógeno, estos materiales fueron sembrados en medio agar papa dextrosa e incubados a 30 °C. La observación se realizó a los 5 días de incubación, evaluando características macro y microscópicas.

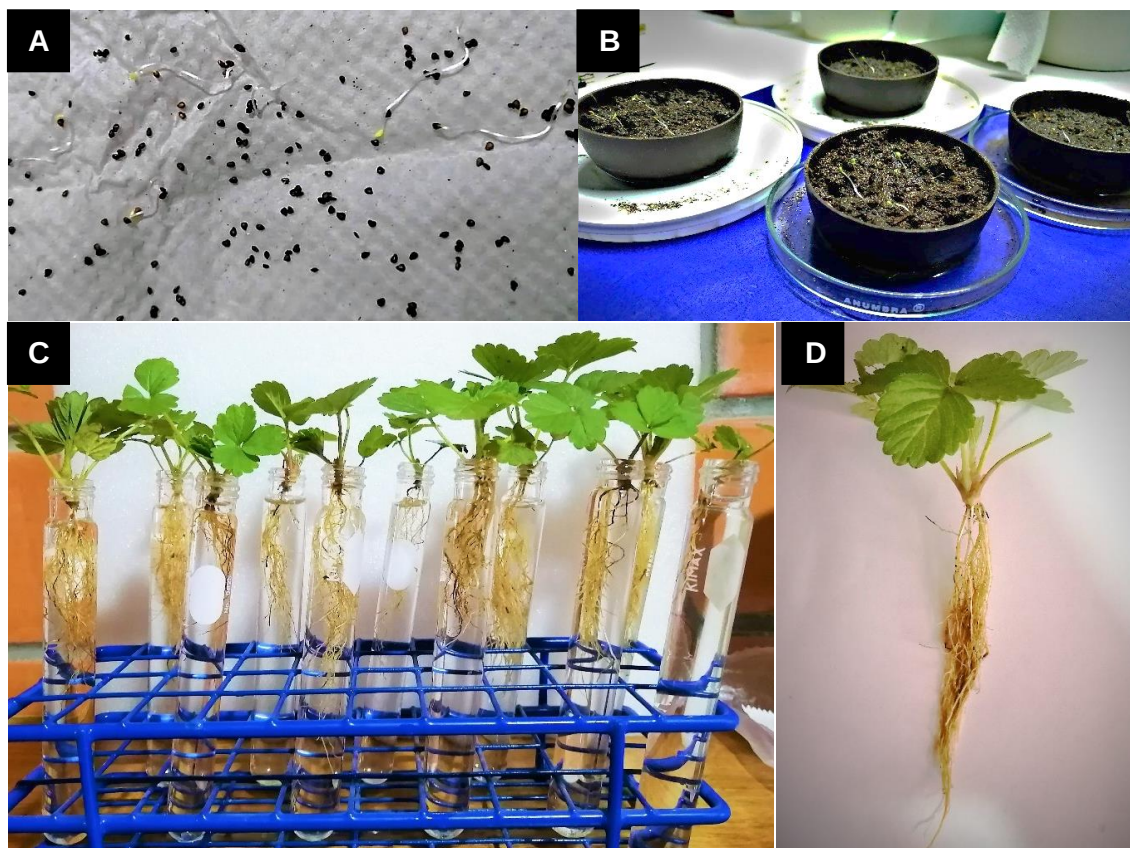


Figura 14. Proceso de germinación de semillas de fresa y selección de individuos para los postulados de Koch. A) germinación de semillas en papel húmedo, B) trasplante de las primeras plántulas, C y D) Plántulas seleccionadas para la infección de sus raíces.

j) Inmovilización de los conidios de *Trichoderma* sp.

Reactivación del material biológico

Cuatro cepas de *Trichoderma* spp. (*T. harzianum* **THT4**, *T. koningiopsis* **M21**, *T. asperellum* **T79** y *T. harzianum* **TPS**) fueron proporcionadas por la colección de hongos del laboratorio 204 “hongos y fitopatología” del CENAGRO VAL 1 perteneciente al ECO CAMPUS VALSEQUILLO de la BUAP. Los hongos se cultivaron en medio de cultivo PDA y se incubaron bajo condiciones de oscuridad y temperaturas de 25 ± 2 °C hasta el llenado de la superficie del medio de cultivo. Durante la incubación se registró el crecimiento radial del micelio cada 24 horas. Con los datos obtenidos se calculó la media de la TCM (tasa de desarrollo micelial) aplicando la fórmula de Romero *et al.*, (2013).

$$\text{Formula: } TCM = \frac{R2 - R1}{D}$$

Donde: R2 es el crecimiento radial al tiempo 2 (cm) y R1 el crecimiento radial al tiempo 1 (cm) y D son los días de incubación que transcurren desde R1 hasta R2. Se compararon las medias de la TCM de las 4 cepas mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el paquete estadístico SPSS versión 25. Al análisis se le agrego la prueba Posthoc Tukey para verificar las diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95 % para el análisis.

Preparación de soluciones encapsulantes

Para la encapsulación de *Trichoderma* spp., con y sin melaza, se prepararon 4 soluciones; 1) solución de alginato de sodio al 2.5 % por medio de disolución a 60 °C, 2) solución de NaCl al 0.9 %, 3) solución de CaCl al 100mM y 4) solución de melaza al 2 %, posteriormente se esterilizaron a 121 °C por 15 min en autoclave.

Encapsulación y almacenamiento

Se utilizaron suspensiones de conidios para preparar gránulos de alginato-de sodio con y sin melaza. Se utilizó el método descrito por Fravel *et al.* (1985), como sigue:

En condiciones estériles, se añadió alginato de sodio (10 g/l) a la suspensión de conidios fúngicos después de añadir el material de base alimenticia (10% de melaza). La mezcla se agitó vigorosamente para permitir una disolución homogénea de los polisacáridos. Luego, la mezcla se extrajo a través de una micropipeta de 20 μ l y se vertió gota a gota en una solución de CaCl_2 de 6 g/l en la que se produjo la gelificación del alginato de sodio en una matriz de alginato de calcio. Se obtuvieron perlas pequeñas que contenían conidios fúngicos atrapados. Las perlas se mantuvieron en la solución de CaCl_2 a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas adicionales para obtener perlas sólidas regulares (figura 15). Se bombeó la solución de CaCl_2 y las perlas se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada. Las perlas frescas se usaron directamente o se mantuvieron a 4-5 °C en matraces sellados durante varios días.

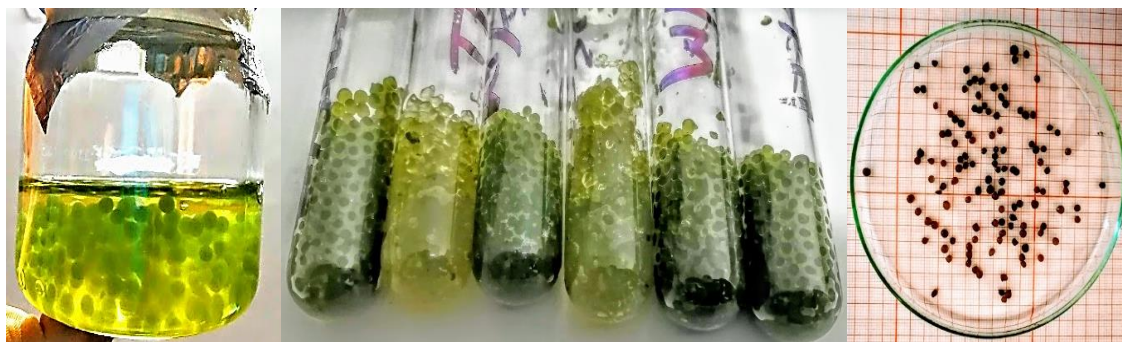


Figura 15. Encapsulados de conidios de *Trichoderma* sp. En perlas de alginato de sodio.

k) Caracterización de los encapsulados

Distribución de tamaño y peso

La distribución de tamaño y peso de las perlas se determinó con una $n = 50$ para cada tratamiento. El porcentaje de uniformidad y la distribución de tamaño se determinó usando imágenes capturadas con ayuda de un microscopio óptico LW Scientific Revelation III y analizando las imágenes con el software ImageJ. Las muestras se situaron sobre una superficie plana para su digitalización y posterior análisis. El peso promedio de las partículas frescas se determinó con el uso de una balanza analítica de precisión electrónica VELAB VE-1000.

Tasa de Pureza y Germinación

La Tasa de pureza (TP) y de germinación (TG) se determinaron tras colocar un total de 7 encapsulados en una placa de medio de cultivo PDA por tratamiento, el experimento se triplicó y se calculó el porcentaje de perlas que desarrollaron micelio a los 5 días y las que no germinaron, además de contar las que presentaron contaminación.

Desarrollo micelial

Para registrar el desarrollo micelial se inocularon de forma independiente una perla en el centro de la placa de Petri con PDA y se tomó lectura del desarrollo hasta el llenado de la superficie del medio de cultivo, además se registró el momento de la esporulación (momento en el que la colonia comenzó a teñirse de tonos de color verde) estos ensayos se hicieron por cuadruplicado para cada tratamiento.

I) Fotoestabilidad

Irradiación

Los tratamientos se sometieron a irradiación de luz UVc (250–270 nm) durante diferentes tiempos; 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 horas (figura 16). Posteriormente a la irradiación de las bio-perlas se tomaron muestras y se inocularon en placas de Petri de 90mm de diámetro con PDA y se incubaron por 7 días para ver su desarrollo post irradiación y determinar si la encapsulación le brinda protección al hongo ante la luz UV. Los experimentos se hicieron por triplicado.

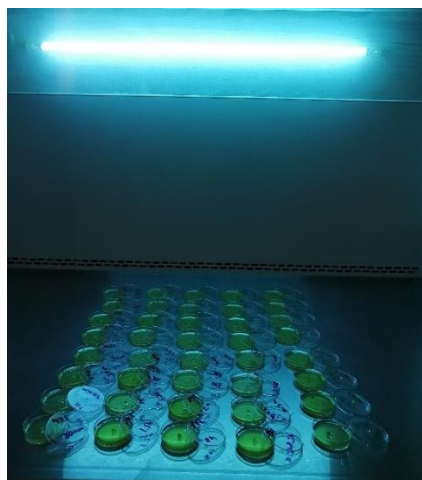


Figura 16. *Irradiación de los encapsulados con y sin melaza y de los conidios libres.*

Área de esporulación y UFC post-irradiación

Se calculó el área de esporulación (cm²) de los ensayos por medio de la digitalización del crecimiento de las colonias fúngicas control y las irradiadas después de 7 días de incubación con ayuda del software ImageJ. A la par, a los mismos ensayos se hizo el conteo de conidios mediante una cámara de Neubauer.

m) Pruebas de antagonismo

Controles

Los controles consistieron en cultivos axénicos de cada uno de los patógenos por cuadruplicado. Se sembraron en el centro de la placa y también en el extremo lo más cercano a la orilla del medio de cultivo. Se mantuvieron condiciones de oscuridad y temperatura de 25 ± 2 °C por 10 días. Al término de la incubación se registró una fotografía del crecimiento para su posterior análisis.

Cultivos duales

Para efectuar los confrontamientos se siguió la metodología descrita por Dennise y Webster (1971). Se inoculó el agente antagónico (conidios libres o encapsulados de *Trichoderma* spp.) en un extremo de la placa de Petri y de forma equidistante se inoculó micelio activo de los hongos aislados del cultivo de fresa, se dejaron incubar bajo condiciones de temperatura ambiente y oscuridad por 10 días y se revisó su crecimiento. Al final de cada experimento se tomó lectura del desarrollo micelial por medio de una imagen fotográfica, se digitalizaron las 3 réplicas de cada tratamiento y se procesaron con el software PicsArt® – Estudio versión 17.1.54 para contrastar las 2 colonias fúngicas. Con las imágenes procesadas se sometieron a un análisis en el software de dominio público ImageJ® para calcular las áreas R1 y R2. A cada imagen se le ajustó la escala en color rojo correspondiente a 90 mm de diámetro para que el programa calculara el área correspondiente a la colonia seleccionada. Con estos datos se calculó el PICR empleando la siguiente fórmula.

$$PICR = \frac{R1-R2}{R1} (100)$$

Donde: **R1** es el área del control (cultivo axénico de cada patógeno por triplicado) y **R2** es el área del organismo antagonizado (cultivo dual de cada hongo aislado por triplicado).

n) Clasificación de los antagonismos

Se uso la escala de antagonismos descrita por Bell *et al.* (1982) para el nivel y la escala de Porter (1923) para el tipo de antagonismo tabla 4 y figura 17.

Tabla 4. Escalas usadas para la clasificación de los antagonismos

Categoría o Nivel	Características	Tipo	Características
1	Colonización del 81-100% de la superficie del medio de cultivo por <i>Trichoderma</i> sp inhibiendo al patógeno.	1	Mutuamente entrelazados
2	Colonización del 61-80 % de la superficie del medio por <i>Trichoderma</i> sp., limitando la colonia patógena.	2	Sobrepuestos
3	Colonización del 41-60% de la superficie del medio por <i>Trichoderma</i> sp., inhibiendo regularmente la colonia patógena	3	Inhibición leve
4	Colonización del 21-40% de la superficie del medio por <i>Trichoderma</i> sp., inhibiendo levemente al patógeno.	4	Crecimiento alrededor
5	Colonización menor al 20% de la superficie del medio sin afectar al patógeno	5	Inhibición a distancia

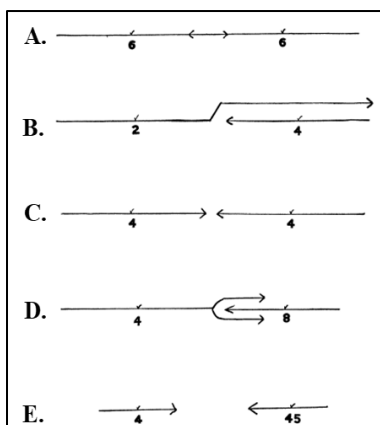


Figura 17. Tipos de Inhibición determinada por Porter (1923).

8. RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

a) Aislamiento y purificación

Se identificaron 5 hongos asociados con el fruto, hojas y raíces de la fresa, se purificaron a través de la técnica punta de hifa y se les colocó un sobrenombre de cepa para su primera identificación, en la tabla 5 se describen las características morfométricas en forma de resumen.

b) Caracterización morfométrica

Cepa MA-Aa20

La cepa Ma-Aa20 mostró características morfológicas del género *Arcopilus* descrito por Wei Wang & Samson (2016), anteriormente descrito como *Chaetomium aureum* (Chivers, 1912). Las colonias mostraron una tasa de crecimiento micelial promedio de 0.268 ± 0.020 cm/día a 25 °C en PDA, alcanzando 3.45 cm de radio promedio después de 10 días a 25 °C. inicialmente la colonia presentó un color blanco, a los 2 días de crecimiento comenzó a virar a un tono amarillo y en la periferia color blanco, así se mantuvo hasta que dejó de crecer, la densidad micelial fue disminuyendo y comenzó el desarrollo de ascocarpos, la coloración también mostró cambios, pasando de amarillo a verde musgo y gris. Durante el desarrollo de la colonia el medio PDA viró a un tono rojo púrpura y a veces rojo óxido. Se observó el desarrollo de ascocarpos (peritecios) en la superficie de la colonia con un diámetro de 15.581 - 137.351 μm , estos presentaron formas globosas y ovaladas con una gran cantidad de pelos laterales hialinos y pelos terminales marrones, en su mayoría en forma de gancho, arqueados, ligeramente enrollados con medidas de $2.389 - 4.602 \times 52.694 - 206.805$ μm (figura 18 B y C). Se observó también la presencia del micelio vegetativo con asomas inmaduros de color marrón sin presencia de pelos laterales. Las hifas que formaron el soma son de tipo tabicadas hialinas con un grosor de 0.544 - 2.081 μm . Las ascosporas de las especies de este género son relativamente diversas. En este estudio no se logró enfocar las ascosporas.

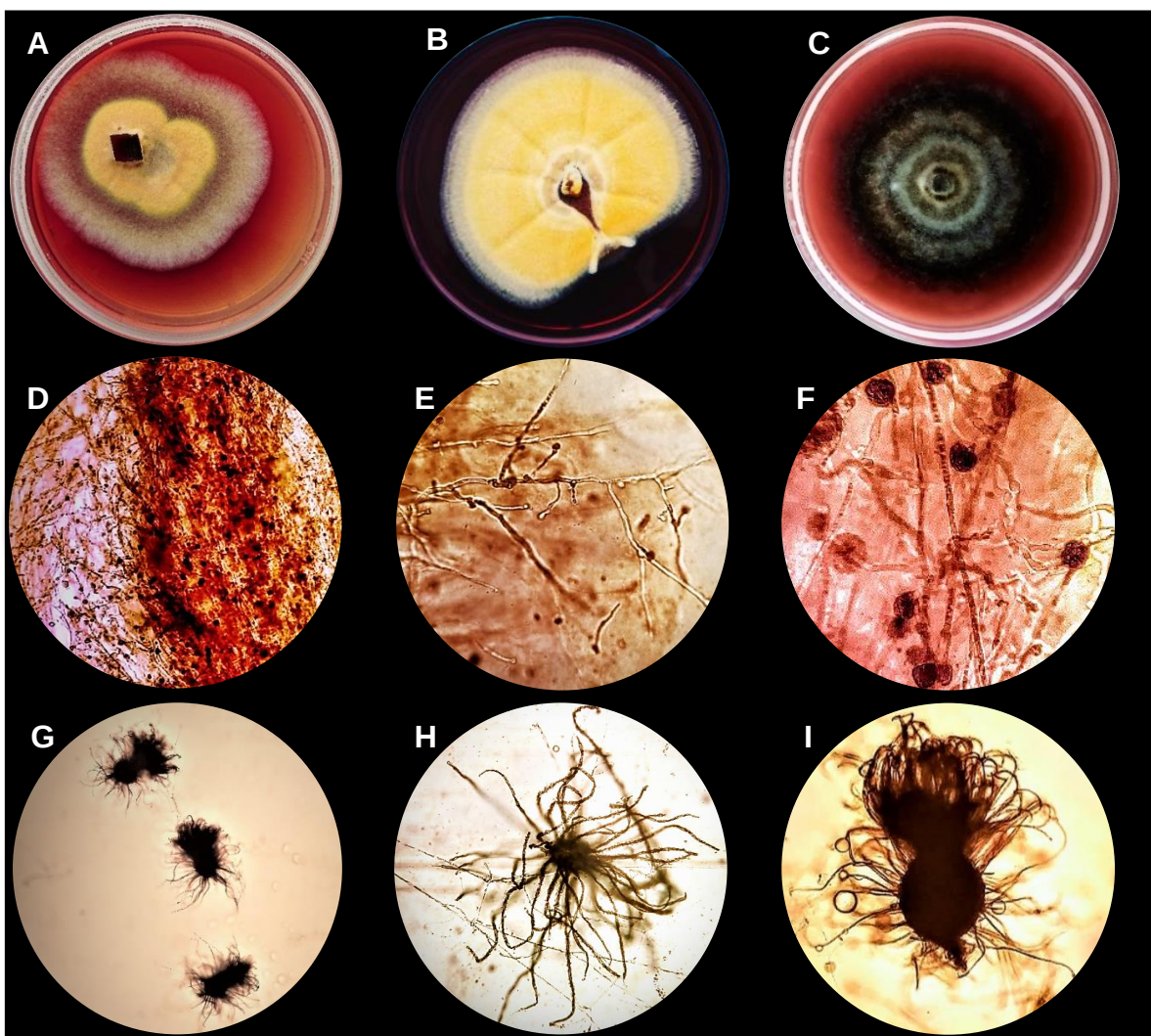


Figura 18. Morfología de *Arcopilus aureus*. A-C) Aspecto de la colonia a los 5, 15 y 30 días de crecimiento respectivamente, D-F) hifas tabicadas hialinas, con el desarrollo de ascocarpos prematuros (10, 40 y 100 X respectivamente), y G-I) peritecios (40 y 100 X).

Cepa MA-Bc20

La cepa MA-Bc20 mostró características morfológicas del género *Botrytis* descrito inicialmente por Micheli, (1729) y Adanson, (1763). Las colonias mostraron una tasa de crecimiento micelial promedio de 0.694 ± 0.037 cm/día a 25 °C en PDA. La coloración de la colonia presentaba tonos de blanco-cremoso Inicialmente (figura 19). Tras acabar con los días de incubación y ser sometida a luz blanca por 24 horas comenzó a desarrollarse micelio aéreo donde las hifas tenían un grosor de (3.895-24.679) (12.442) μm (n=100). Además, se observaron conidióforos con un promedio en su diámetro de 26.549–169.494 (71.614) μm (n=50), para entonces las colonias

fúngicas se tornaron de color gris -verdoso. Las esporas desprendidas de los conidióforos presentaron formas ovaladas con medidas de $5.699\text{-}14.452\text{ (}10.095\text{)} \times 4.489\text{-}8.703\text{(}6.075\text{)}\text{ }\mu\text{m}$ ($n=100$). También se observó el desarrollo de esclerocios solitarios y en agregados en la superficie de las colonias, la mayoría negros con formas variables entre esféricas, oblongas a elípticas o irregulares con un área de $0.493\text{-}4.903\text{ (}1.96\text{)}\text{ mm}^2$.

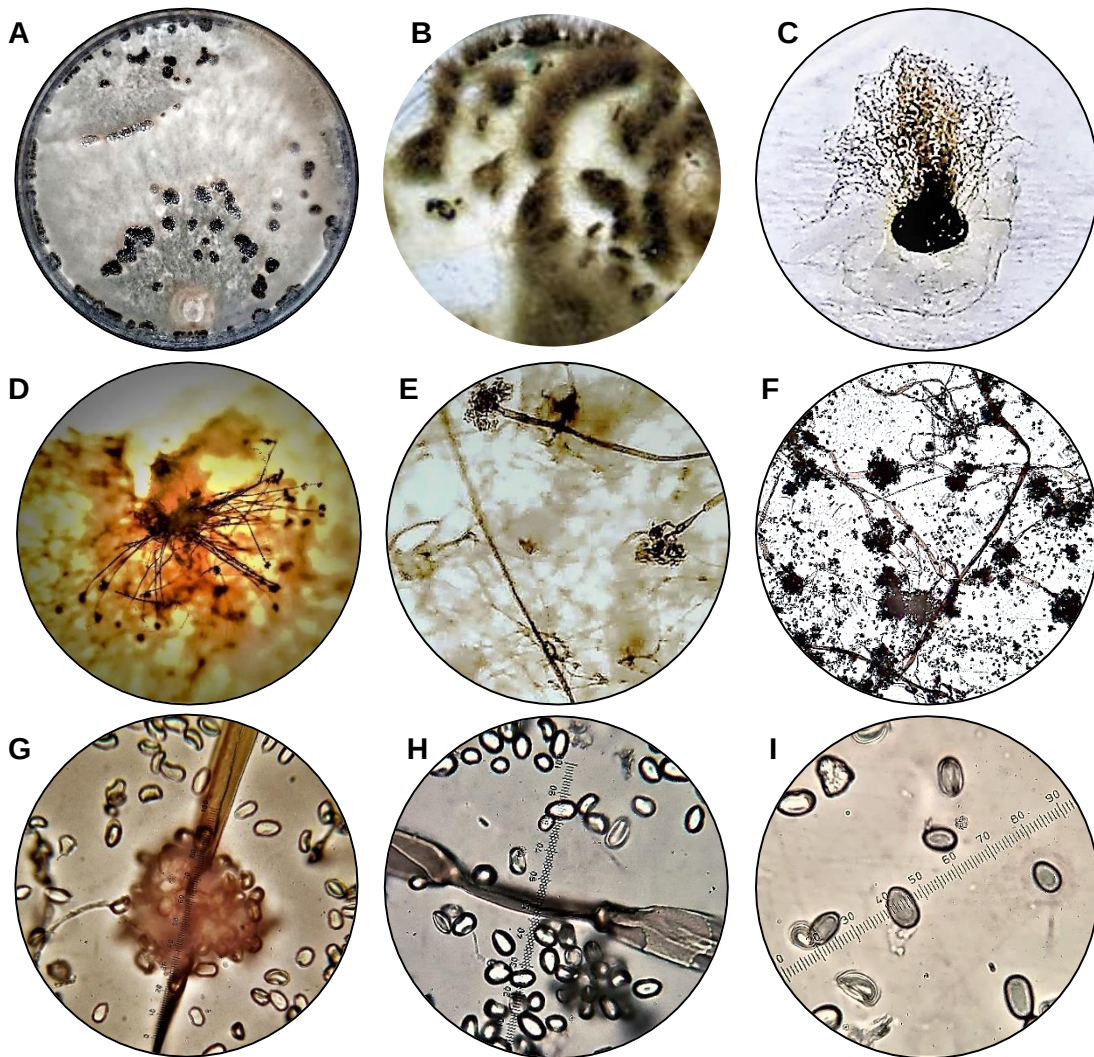


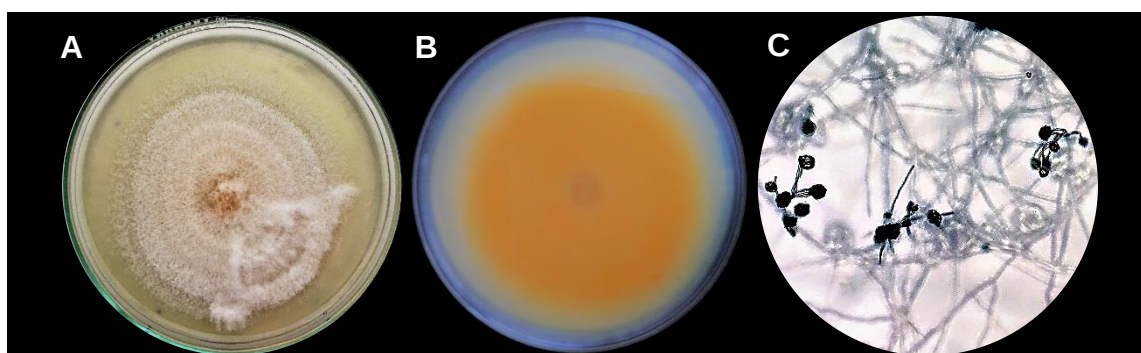
Figura 19. Morfología de *botrytis* sp. A) Esclerocios típicos del género, B) Textura de la colonia esporulando, C) Esclerocio 40X, D-F) conidióforos (10 y 40X), G) Conidióforos 100X, H) Hifas septadas con ligeros enrollamientos típicos del género y J) conidios (100X).

Cepas MA-Fc120 y MA-Fc220

La caracterización morfométrica de las cepas MA-Fc1-20 y MA-Fc220 mostraron características similares a la de los hongos pertenecientes al género *Fusarium* (figura 20). El cual está conformado por hongos imperfectos cosmopolitas de gran interés para los micólogos, fitopatólogos y agricultores debido a sus características altamente patogénicas para distintas plantas (Nelson *et al.*, 1981).

La cepa MA-Fc1-20 presentó colonias de color blanco y texturas granulares y polvorientas, no se observó micelio aéreo. Su tasa de desarrollo micelial promedio fue de 0.36132 ± 0.019818 cm/día a 25 °C en medio de cultivo PDA. El soma estaba formado por hifas septadas de 2.579-9.58 (5.789) μm de ancho (n=50), en algunas se observaron cabezas falsas de 18.497-72.566 (29.906) μm de diámetro. Las microconidias tenían 9.178-14.791 (12.78) μm de largo $\times$ 3.649 - 4.473 (4.232) μm de ancho (n=50). También se observaron macroconidias de 15.054 - 33.729 (21.33) μm de largo $\times$ 4.482- 7.336 (5.256) μm de ancho (n=50).

La cepa MA-Fc220 mostro una coloración blanca de la colonia y el medio de cultivo teñido de morado en ocasiones rosa. Su textura es algodonosa con abundante micelio aéreo. La tasa de desarrollo micelial de las colonias fue en promedio de 0.533 ± 0.0395035 cm/día en medio de cultivo PDA. Se observaron características microscópicas como las microconidias de forma ovoide con medidas de 1.647- 4.633 (2.78178) μm de ancho $\times$ 4.98- 25.933 (9.762) μm de largo (n=50). Las hifas que conformaban el soma eran septadas. También se observaron macroconidias típicas del género, de forma lunar con 4 septos por cada macroconidia, estas mostraron medidas de 1.557-3.562 (2.569) μm de ancho por 6.279-40.191(20.287) μm de largo. También se observó la formación de clamidosporas con diámetros de 5.967-12.537 (9.81) μm (n=50).



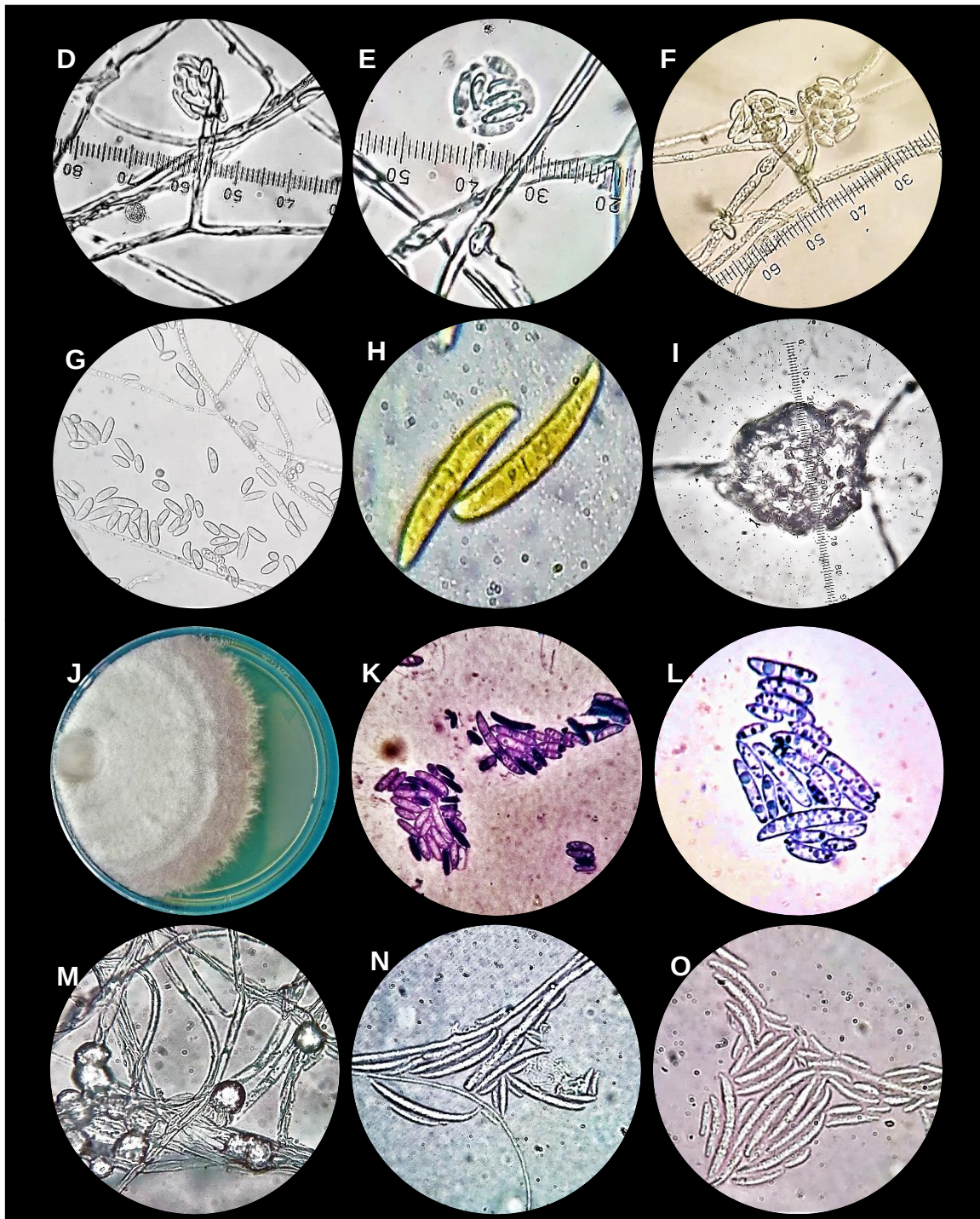
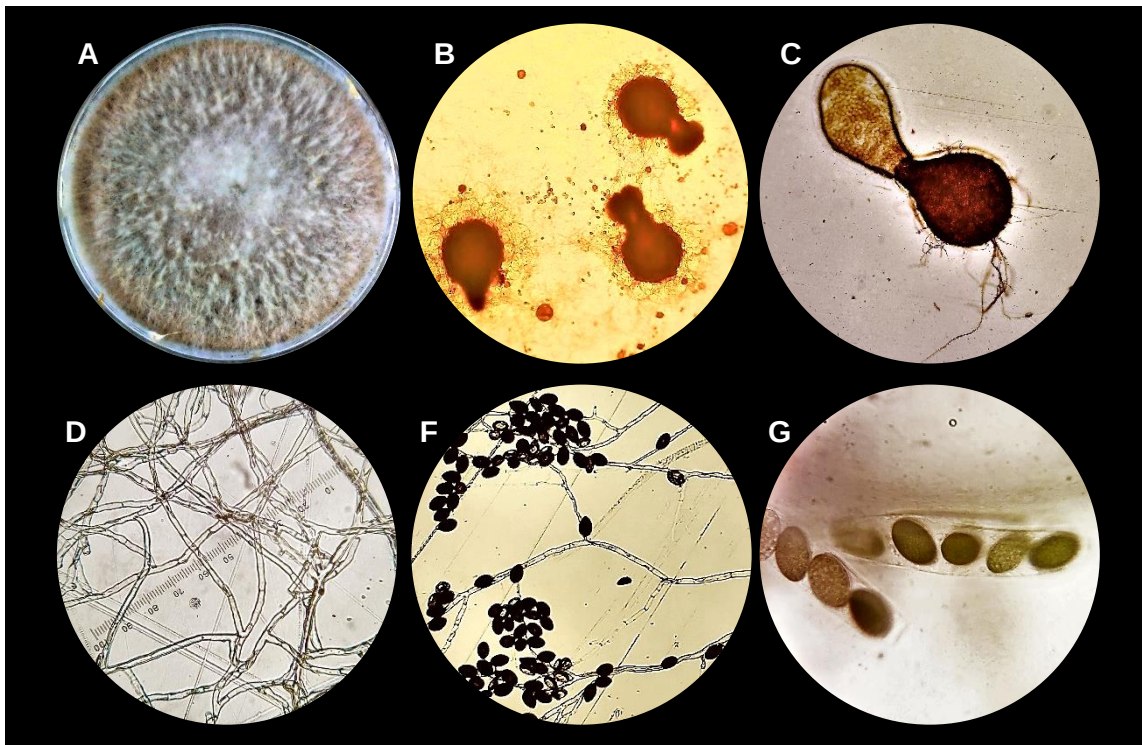


Figura 20. Morfología de *Fusarium* sp., cepas C120 y C220 A) Aspecto de la colonia sobre medio de cultivo PDA, B) Coloración al reverso de la colonia, C-F) Cabezas falsas de microconidias sostenidas en monofiálides vistas a 40x y 1000x, G-H) microconidias y macroconidias vistas a 400 y 1000x respectivamente, I) Clamidospora vista a 1000x, J) Aspecto de la colonia sobre PDA (MA-Fc220), K-L) Microconidias tenidas con azul de metileno vistas a 100x, M) Clamidosporas (100x) y N-O) Macroconidias en forma lunar alargadas, ligeramente curvadas (100x).

Cepa MA-Nd20

La cepa MA-Nd20 se identificó morfológicamente con un hongo perteneciente al género *Neurospora* sp., descrito por Shear y Dodge (1927), las características fenológicas se aprecian en la figura 21. La colonia tuvo una tasa de desarrollo micelial prodigiosa de 1.74 ± 0.144 mm/día. Las colonias eran blancas inicialmente, sin embargo, la coloración comenzó a cambiar a un gris después de haber colonizado toda la superficie del medio de cultivo, a los 10 días de incubación comenzaron a desarrollarse peritecios que median entre 0.5-0.7 (0.65) mm (n =50) de diámetro, al principio son de color verde militar, cuando alcanzan la madures se viran a un tono negro lustroso. Las ascas son cilíndricas, alargadas, unitunicadas sin poro apical, presentaron medidas de $208-230$ (220) $\times$ $20-23$ (21) μm (n=50) y en su interior hay un total de 8 ascosporas, las ascosporas presentan una forma ovoide, inicialmente son hialinas y se van tornando a café obscuro, estas midieron entre $20-22$ (20) $\times$ $26-30$ (29) μm (n=50). El micelio fue septado con un grosor de $2-2.5$ (2.2) (n=50).



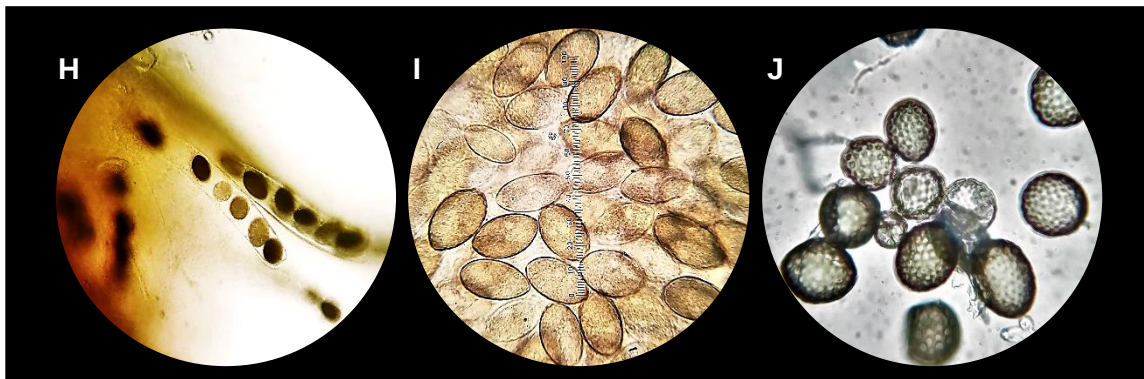


Figura 21. Morfología de MA-Nd20. A) Aspecto de la colonia creciendo en medio PDA, B-C) Peritecios vistos a 4 y 10x, D) Hifas septadas sin presencia de esporulación, E) Hifas septadas con presencia de conidios libres, F-G) Ascas con presencia de conidios hialinas y oscuras (100x) y H-I) Conidios inmaduras (hialinas) y completamente maduras (oscuras) vistas a 100x.

c) Identificación molecular

Para las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de la cepa MA-FC120, una búsqueda BLASTn mostró 99.85 y 100 % de identidad con secuencias de nucleótidos de *F. solani* de NCBI correspondientes a TEF-1 α (MN650097.1) e ITS, (MT605584.1) respectivamente. En el caso de las secuencias de MA-FC220, la búsqueda mostró 100 y 99.67 % de identidad con secuencias de nucleótidos de *F. oxysporum* correspondientes a ITS (MN235858.1) y TEF-1 α (MK906806.1) respectivamente. En el caso de las secuencias de MA-Aa20 la búsqueda mostró 100 y 100 % de identidad con secuencias de nucleótidos de *Arcopilus aereus* correspondientes a ITS 4 (MW318994.1) e ITS 5 (MW318995.1), para la región TEF-1 α el porcentaje más alto de identidad fue de 97.32 % correspondiente a la especie de *Chaetomium globosum*. Las secuencias de nucleótidos de la cepa MA-Nd20 mostraron un porcentaje de identidad de 100 y 97.11 % con regiones de ITS 1-2 (MW520112.1) y TEF-1 α (FR774348.1) correspondientes a la especie *Neurospora dictyophora*. La última secuencia de nucleótidos fue de la cepa MA-Bc20 y su búsqueda en BLASTn mostró un 99.78 % de identidad con secuencias de nucleótidos de *Botrytis cinerea* correspondientes a ITS 4 (MT573470.1). La caracterización molecular de los 5 aislamientos asociados al cultivo de fresa de la comunidad de Analco de Ponciano Arriaga (Sta. Cruz Analco) permitió identificar 5

especies; *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Arcopilus aereus*, *Neurospora dictyophora* y *Botrytis cinerea*.

Tabla 5. Características generales de crecimiento.

Cepa	Origen	Textura	Densidad	Micelio	Color	TCM ± ES (cm/día)
MA-Fc120	Tallo	L	Media	mc	Blanco	0.36132 ± 0.019
MA-FC220	Raíces	Al	Alta	mc	Rosa-purpura	0.533 ± 0.039
MA-Aa20	Tallo	At	baja	mv	Amarillo-rojo	0.268 ± 0.02
MA-Nd20	Fruto	Al	Muy alta	mc	Rosa salmón-Gris	1.74 ± 0.144
MA-Bc20	Fruto y tallo	Al	Alta	Mc	Gris-verde	0.694 ± 0.037

*L, lanosa; Al, algodonosa; At, Aterciopelada; ma, micelio aéreo; mv, micelio vegetativo y mc, ambos micelios.

d) Filogenia

El análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos confirmó que los aislados pertenecen a las especies de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Arcopilus aereus*, *Neurospora dictyophora* y *Botrytis cinerea*, los respectivos arboles filogenéticos se observan en las figuras 22-26.

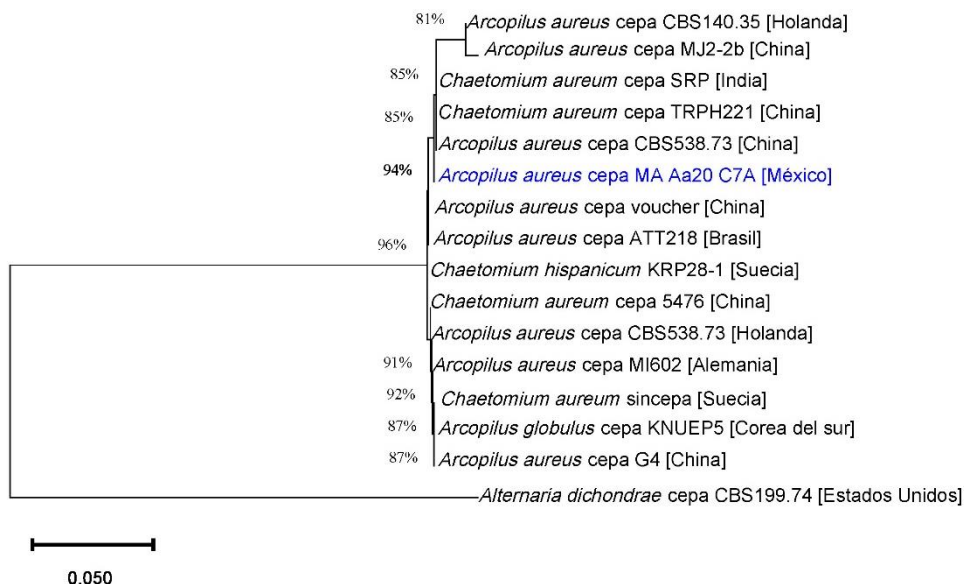


Figura 22. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético generado a partir de secuencias ITS. *Alternaria dichondrae* se utilizó como grupo externo. Las cepas MA-Aa20(c7) obtenidas en este estudio se muestran en azul.

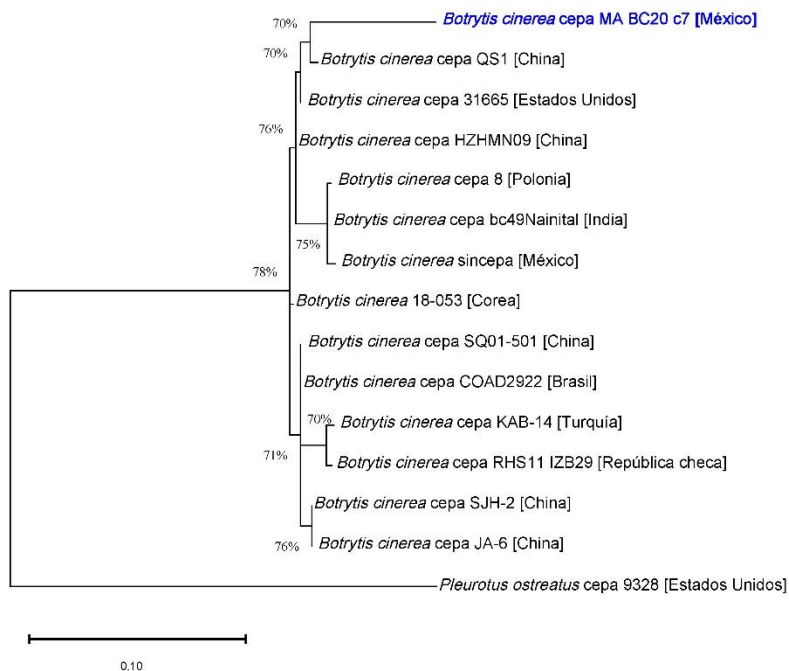


Figura 23. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético generado a partir de secuencias ITS. *Pleurotus ostreatus* se utilizó como grupo externo. La cepa MA-Bc20 obtenidas en este estudio se muestran en azul.

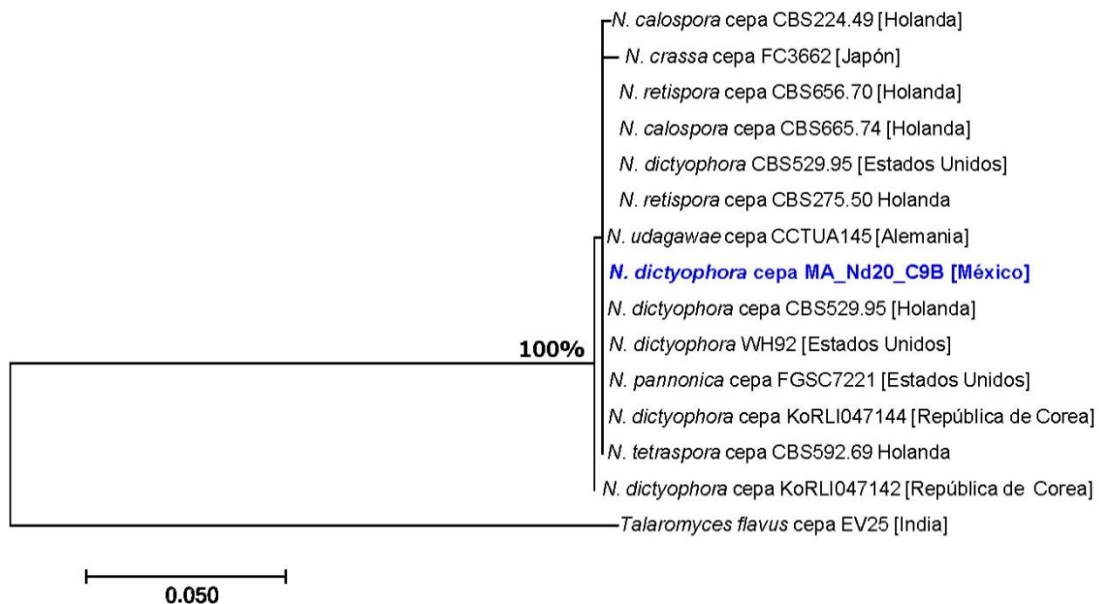


Figura 24. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético generado a partir de secuencias ITS. *Talaromyces flavus* se utilizó como grupo externo. La cepa MA-Nd20(c9b) obtenidas en este estudio se muestran en azul.

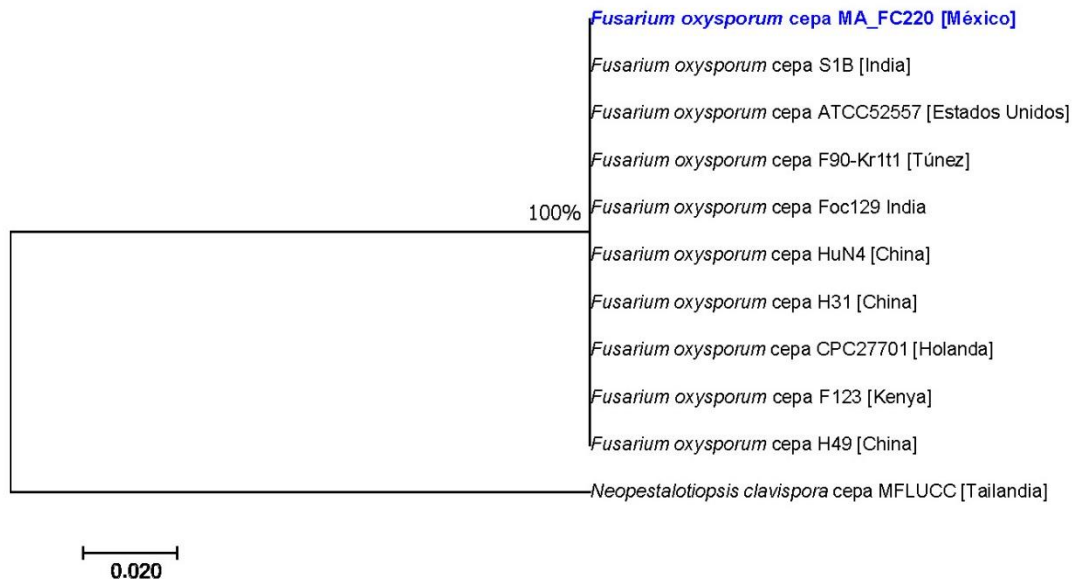


Figura 25. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético generado a partir de secuencias ITS. *Neopestalotiopsis clavispora* se utilizó como grupo externo. La cepa MA-FC220 obtenidas en este estudio se muestran en azul.

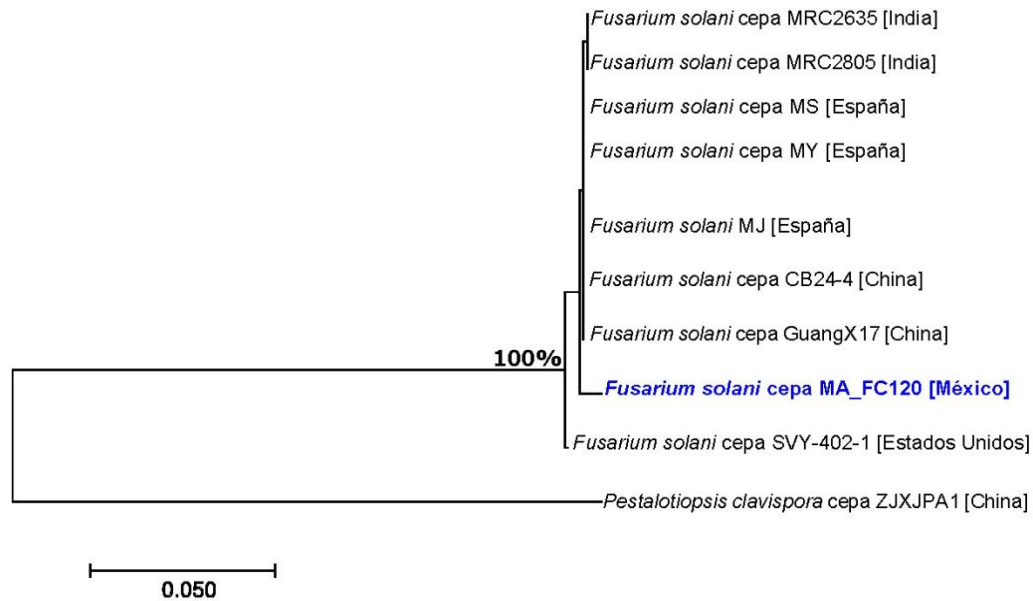


Figura 26. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético generado a partir de secuencias ITS. *Pestalotiopsis clavispora* se utilizó como grupo externo. La cepa MA-FC120 obtenidas en este estudio se muestran en azul.

e) Postulados de Koch

Pruebas de patogenicidad de *Arcopilus aereus* sobre trifolios de fresa

Los ensayos de patogenicidad de *A. aereus* cepa MA-Aa20 mostraron como resultado un total negativo para ser patógeno foliar de la fresa después de incubarlos por un periodo de 15 días en cámara húmeda. Aunque, algunas hojas expusieron síntomas de pérdida de turgencia estos no correspondían a la contaminación del hongo *A. aereus*, por tanto, al final de la prueba se intentó aislar nuevamente, y en ningún caso se encontró crecimiento o desarrollo de la especie en cuestión en condiciones *in vitro* (figura 27). Los síntomas de necrosis o pérdida de turgencia probablemente se deben a que evidentemente el tejido se aisló del organismo completo (fresa) y las células comenzaron con un proceso de muerte. Es muy probable que *A. aereus* sea un hongo asociado a los cultivos de fresa ya sea de naturaleza endofítica o como un hongo saprofito, tal cual se ha reportado para el caso de las plantas *Vitis vinífera* (Dwibedi y Saxena, 2018) o *Thymelaea lythroides* (Kabbaj *et al.*, 2015).

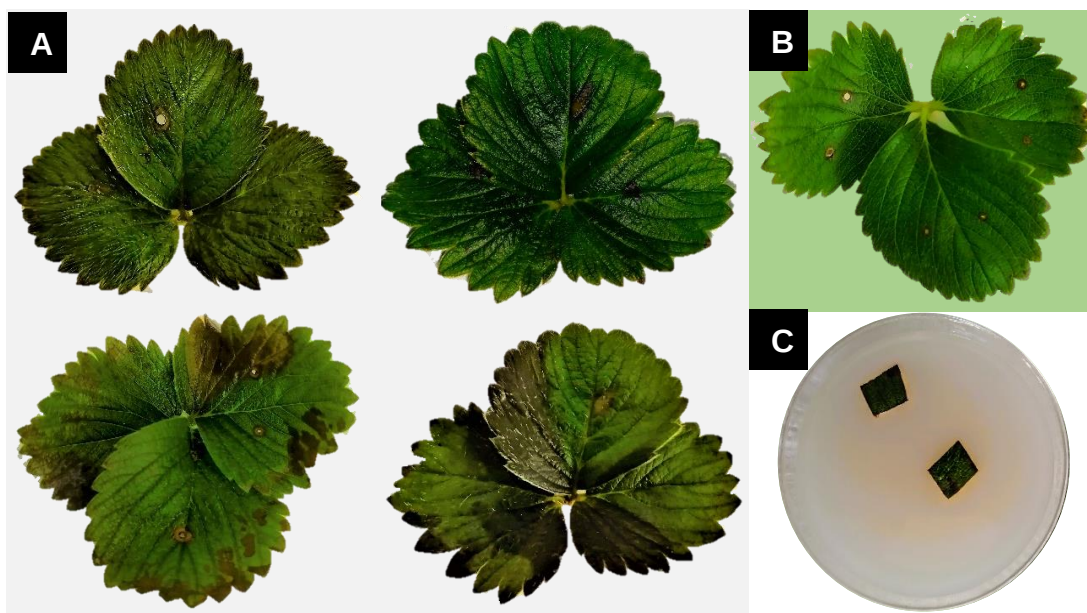


Figura 27. Ensayos de patogenicidad de *A. aerus* MA-Aa20 sobre trifolios de fresa. A) Principal apariencia de los trifolios 15 días posterior a la inoculación, B) trifolio control a los 15 días del ensayo y C) resultados negativos para el aislamiento de *A. aerus* en medio PDA.

Pruebas de patogenicidad de *Neurospora dictyophora* sobre frutos de fresa

Las pruebas de patogenicidad para *N. dictyophora* sobre frutos de fresa dieron como resultado positivo a ser los agentes causales de la pudrición blanda en frutos maduros. En todos los ensayos la pudrición comenzó a notarse desde el día 3 al 5, para terminar por contaminar todo el fruto en un periodo de 10 a 15 días aproximadamente (figura 29). Los síntomas y signos son un ligero hundimiento en la zona de inoculación y un rápido desarrollo micelial del hongo a las 24 horas de la inoculación a 30 °C, la fruta se pudrió y se cubrió con micelio blanco, además de cambiar su color de un rojo-carmín a un rojo-oxido y comenzó el desarrollo de los ascomas verde-militar a los 6 días de haber inoculado las frutas. Las frutas control no mostraron la enfermedad, solo perdieron un poco de turgencia por la desecación debido a la temperatura, pero no hubo ningún signo del hongo (figura 28). Los resultados muestran que *N. dictyophora* puede fungir como patógeno para los frutos de fresa y su infección está mediada por heridas y condiciones de temperatura preferiblemente no menores a 30 °C. El hongo inoculado se volvió a aislar a partir de los frutos contaminados (figura 29). La presencia de este hongo en fresas bajo invernaderos plásticos puede deberse a la escasa ventilación y el aumento de la

temperatura cercana a los 40 °C, ya que estas temperaturas son óptimas para la germinación de especies de *Neurospora* sp., (E.U. Selker, 2017), además de que (McCluskey y Baker, 2017) mencionan a las especies de *N. crassa* como organismos competentes para la rápida degradación de la pared celular vegetal. Además de preferir tejidos ricos en carbohidratos, como lo son las frutillas de la fresa. Si bien, el estilo de vida de los hongos pertenecientes al género *Neurospora* aún sigue bajo investigación para entender su asociación con las plantas vivas (Gladieux *et al.*, 2015), existe evidencia de especies como *N. crassa* que pueden fungir como patógeno sobre plántulas de pino silvestre (*Pinus sylvestris*) y como un organismo endófito en plantaciones artificiales de *Acer ginnala* (Amur Maple) en el noreste de China (Qi *et al.*, 2012). Galagan *et al.* (2003), mencionan que la secuencia del genoma de *Neurospora* sp., contiene numerosos genes similares a los necesarios para la patogénesis de las plantas identificados en patógenos fúngicos, Además, de que contiene todos los componentes de transducción de señales implicados en la patogénesis de los ascomicetos que se han descrito hasta ahora.

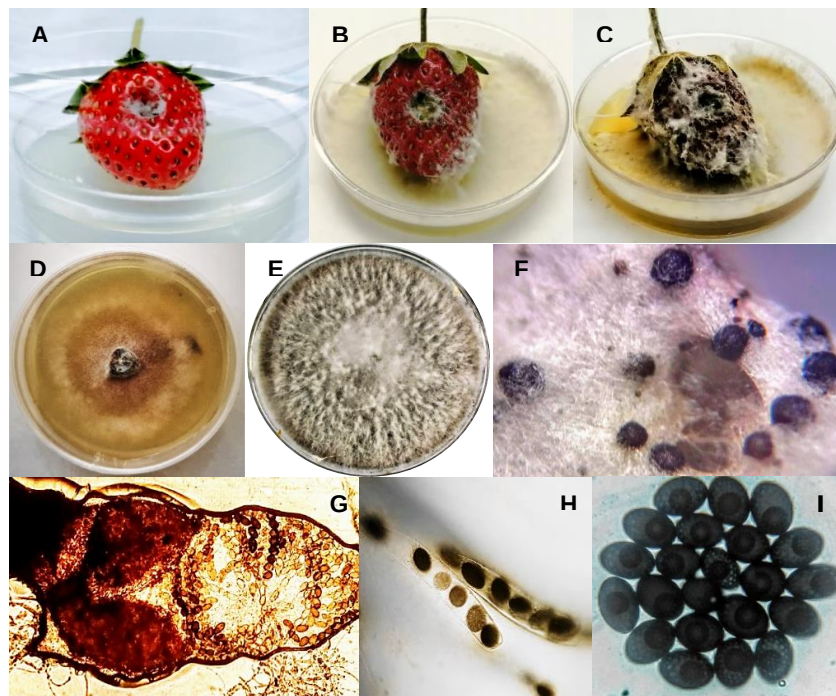


Figura 28. A-C) Desarrollo de la pudrición a los días 1, 3 y 5 respectivamente, D) Aislamiento del patógeno a partir de las pruebas de patogenicidad en fruto, E) Colonia a los 10 días sobre medio PDA, F) Ascomas vistos a 10X, G) Ascomas liberando esporas, H) ascas unitunicadas sin poro (40X) e I) ascosporas características del género *Neurospora*.

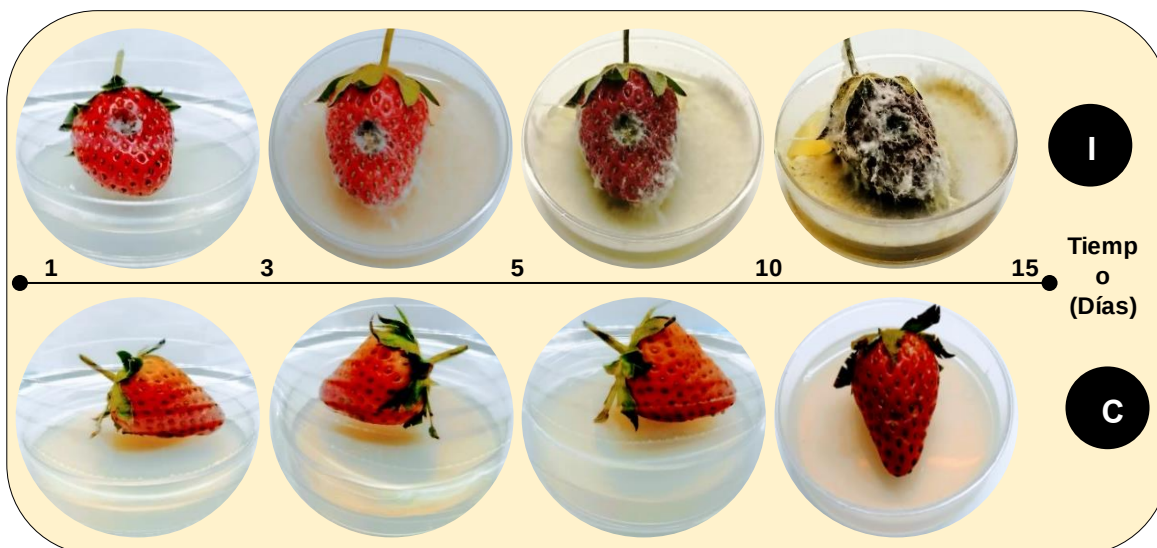


Figura 29. Desarrollo de la enfermedad de "Pudrición del fruto" causada por *N. dictyophora* en frutos de fresa. I) fruto infectado y C) fruto control.

Pruebas de patogenicidad de *F. oxysporum* sobre plantas propagadas a partir de semillas

Los postulados de Koch dieron positivo para la cepa MA-FC220 perteneciente a la especie de *F. oxysporum* sobre plántulas de fresa variedad Camino Real de 2 meses de edad. Las plantas infectadas mostraron síntomas típicos de marchitamiento vascular, decoloración externa e interna de los tallos, clorosis foliar y muerte, a los 15 y 20 días de haber sido infectadas con *F. oxysporum*. Se hizo nuevamente el aislamiento a partir de coronas de plantas que mostraron los síntomas y se reforzaron los resultados positivos de que la cepa MA-FC220 funge como el agente causal del Marchitamiento Vascular (Mv) de la fresa variedad Camino Real de la zona de Santa Cruz de Analco de San Salvador el Verde - Puebla. En la figura 30 se describe la severidad de la enfermedad, la cual coincide con el grado 3 y 4 a los 15 y 20 días respectivamente, según lo establecido por Forero *et al.*, (2015). debido a que en los primeros 15 días se observó defoliación y pardeamiento en la zona basal de los tallos, el grado 4 de severidad se presentó hasta los 20 días posteriores a la inoculación, pues el 90 % de las plantas habían muerto y el 10 % restante mostro signos de marchitez vascular (figura 31).

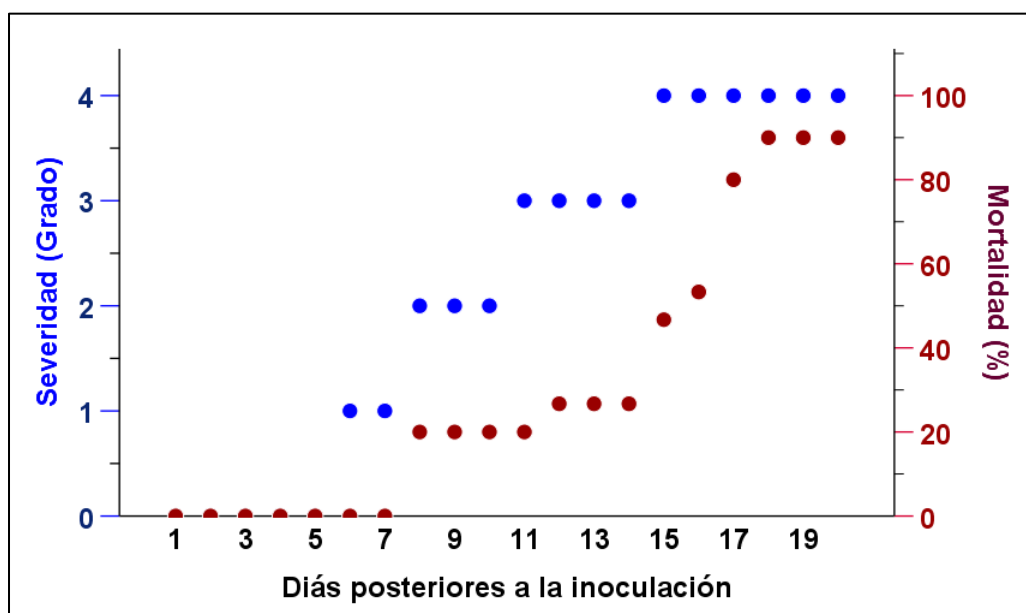


Figura 30. Severidad en plantas de Fresa sp., de 2 meses de edad inoculadas con *F. oxysporum* MA-FC20



Figura 31. Postulados de Koch de *F. oxysporum* MA-FC20 sobre plantas de fresa. A) Severidad del patógeno a los 10 y los 20 días, B) Planta control a los 20 días, C) ejemplar infectado del cual se aisló el patógeno a los 25 días y D-F) Cepa de *F. oxysporum* aislada de las coronas y raíces.

Pruebas de patogenicidad de F. solani sobre plantas adultas de fresa

En el caso de las plantas de 2.5 años de edad, mostraron signos y síntomas de enfermedad ocasionados por el hongo *F. solani* cepa MA-FC120 durante el tiempo de análisis (45 días), las plantas comenzaron a carecer de características fisiológicas de una planta sana desde los primeros 10 días posteriores a la infección, aunque los síntomas no se agravaron con el paso del tiempo, si avanzaron en la escala de severidad del grado 2 al 3 según las notas establecidas por Forero *et al.*, (2015). El principal síntoma fue la pérdida de turgencia y marchitez vascular generalizado (figura 32), concordando con lo reportado por Pastrana *et al.* (2014). A pesar de que las plantas infectadas mostraron marchitez y pérdida de folíolos no hubo muerte de ningún ejemplar, al contrario, posteriormente a los 45 días se observó rebrotes de plantas infectadas, es decir; lograron recuperarse progresivamente. Pero con estragos como un lento desarrollo de tejidos, lo cual se conoce como enanismo y concuerda con lo reportado por Pastrana *et al.* (2014) en plantas de fresa de la variedad “Camarosa” y Villarino *et al.* (2019). El hongo *F. solani* fue vuelto a aislar a partir de tejidos radiculares con signos de necrosis en medio de cultivo PDA (figura 29) demostrándose los postulados de Koch, aislando 100 % el agente causal de tejidos sintomáticos.



Figura 32. Postulados de Koch de *F. solani* MA-FC120 sobre plantas de fresa. A-D) Principales síntomas de Pérdida de turgencia y Marchitez vascular, E-F) re-aislamiento del patógeno desde raíces sintomáticas.

Pruebas de patogenicidad de *Botrytis cinerea* sobre frutos de fresa

Los resultados de las pruebas de patogenicidad para la cepa MA-BC20 de *B. cinerea* dieron positivo para ser agente causal de pudrición de frutos o enfermedad del “moho gris” en plantas de fresa y además ser el agente causal de necrosis de tejidos foliares (tallo, hojas y corona) lo cual indica que el estilo de vida del patógeno es de carácter necrótrofo al menos para esta cepa según lo reportado en la última década por autores como Cheung *et al.* (2020), Van *et al.* (2014) y Zhong *et al.* (2019). Los ensayos en cámara húmeda y en plantas en maceta revelaron la alta velocidad de infección del patógeno sobre los frutos maduros, logrando colonizar todos los frutos en un lapso de tiempo de 5 a 7 días, colocando la pudrición del fruto en una escala 4 de severidad siendo la más alta, logrando la colonización del 100 % del fruto, concertando con Leiva *et al.* (2014) y clasificando a la cepa MA-Bc20

de *B. cinerea* como un patógeno altamente destructivo de frutos y tejidos de fresa variedad Camino Real. Los daños de necrosis sobre los tejidos de la fresa se pueden visualizar en la figura 33, revelando la fase neurotrófica y saprofítica del patógeno sobre los tejidos muertos de su hospedero. El patógeno se reisoló de los frutos infectados y se acertó con los postulados de Koch (figura 33).

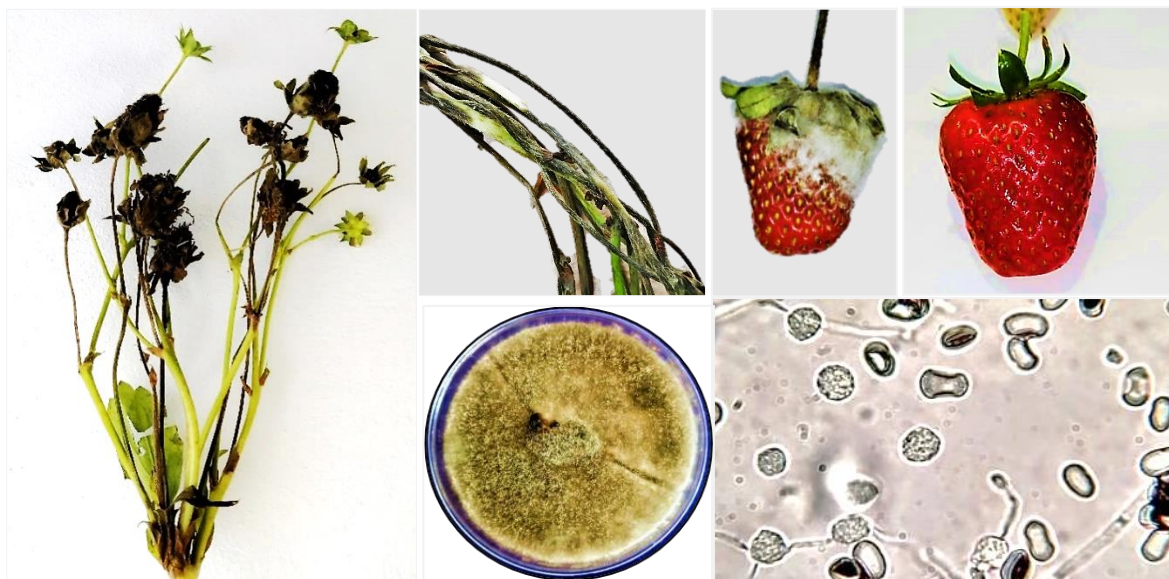


Figura 33. Pruebas de patogenicidad de *B. cinerea* MA-Bc20 sobre frutos y plantas de fresa var. "Camino Real". A-B) signos y síntomas del moho gris sobre los tejidos foliares y frutos 25 días después de la inoculación de *B. cinerea*, C) Signos *B. cinerea* sobre el fruto en cámara húmeda 5 días después de la infección, D) fruto control sin síntomas y E-F) re-aislamiento del patógeno directamente de fruto y microscopia de las esporas (100 X).

f) Encapsulación de conidios de *Trichoderma* sp.

Tasa de crecimiento micelial y reactivación de las cepas

Las 4 cepas de *Trichoderma* sp., se reactivaron en medio de cultivo PDA y sus TCM revelaron diferencias estadísticamente significativas entre sus medias, tanto los conidios libres como los encapsulados (simples y enriquecidos con melaza) se agruparon en distintos subconjuntos tras emplear la prueba de HSD Tukey (figura 34). Los encapsulados (enriquecidos con melaza) de *T. harzianum* TPS y *T. asperellum* T79 exhibieron los valores de TCM más altos paralelo al resto de tratamientos, siendo los valores; 1.16750 ± 0.023585 y 1.175 ± 0.01606 cm/día respectivamente. En el último subconjunto se agrupó a un solo tratamiento,

presentando la media de TCM más baja del experimento, este valor corresponde a la TCM (0.83 ± 0.0136 cm/día) de *T. koningiopsis* encapsulado.

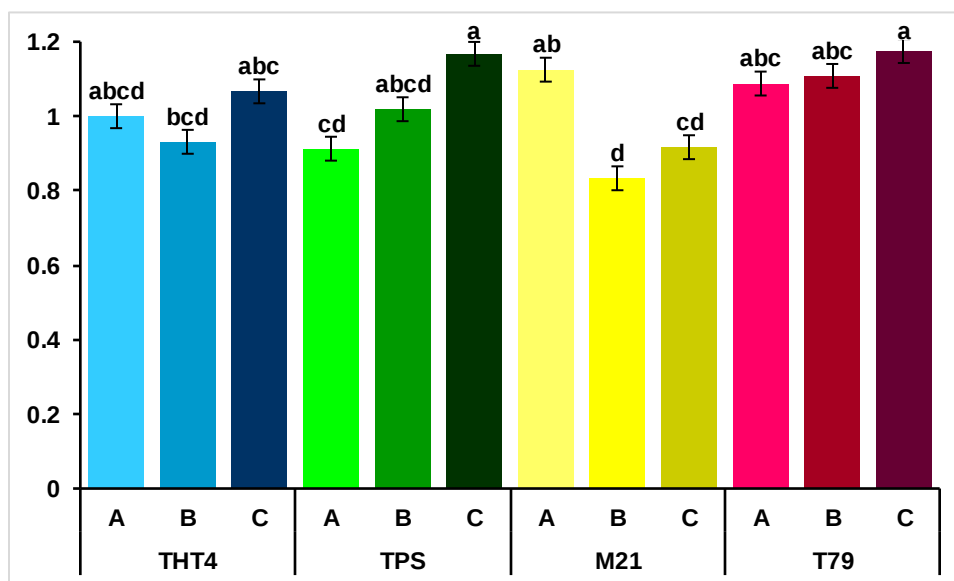


Figura 34. Tasa de crecimiento micelial promedio. Para cada cepa hay 3 tratamientos; A) conidios libres, B) Conidios encapsulados y C) Conidios encapsulados + melaza. *Diferentes letras (a, b, c y d) sobre la desviación estándar de la media muestras diferencias estadísticamente significativas para la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

Las TCM determinan el crecimiento de cada cepa de *Trichoderma* sp. En la figura 35 se ilustra las curvas de crecimiento, evidenciando que el encapsular conidios y someterlos a condiciones de incubación universales para hongos no siempre es favorable si se busca aumentar la velocidad de desarrollo micelial, pues si bien 3 cepas (THT4, TPS y T79) respondieron de forma positiva a la inmovilización en partículas de alginato a la hora de inocularlos en PDA y someterlos a condiciones de crecimiento, la cepa M21 de *T. koningiopsis* no mostro el mismo patrón, siendo su mejor desarrollo a partir de conidios libres y no inmovilizados. Además, se visualiza una tendencia donde algunos encapsulados enriquecidos (THT4, M21 y T79) y sus respectivos controles, crecen sutilmente más rápido que los encapsulados simples.

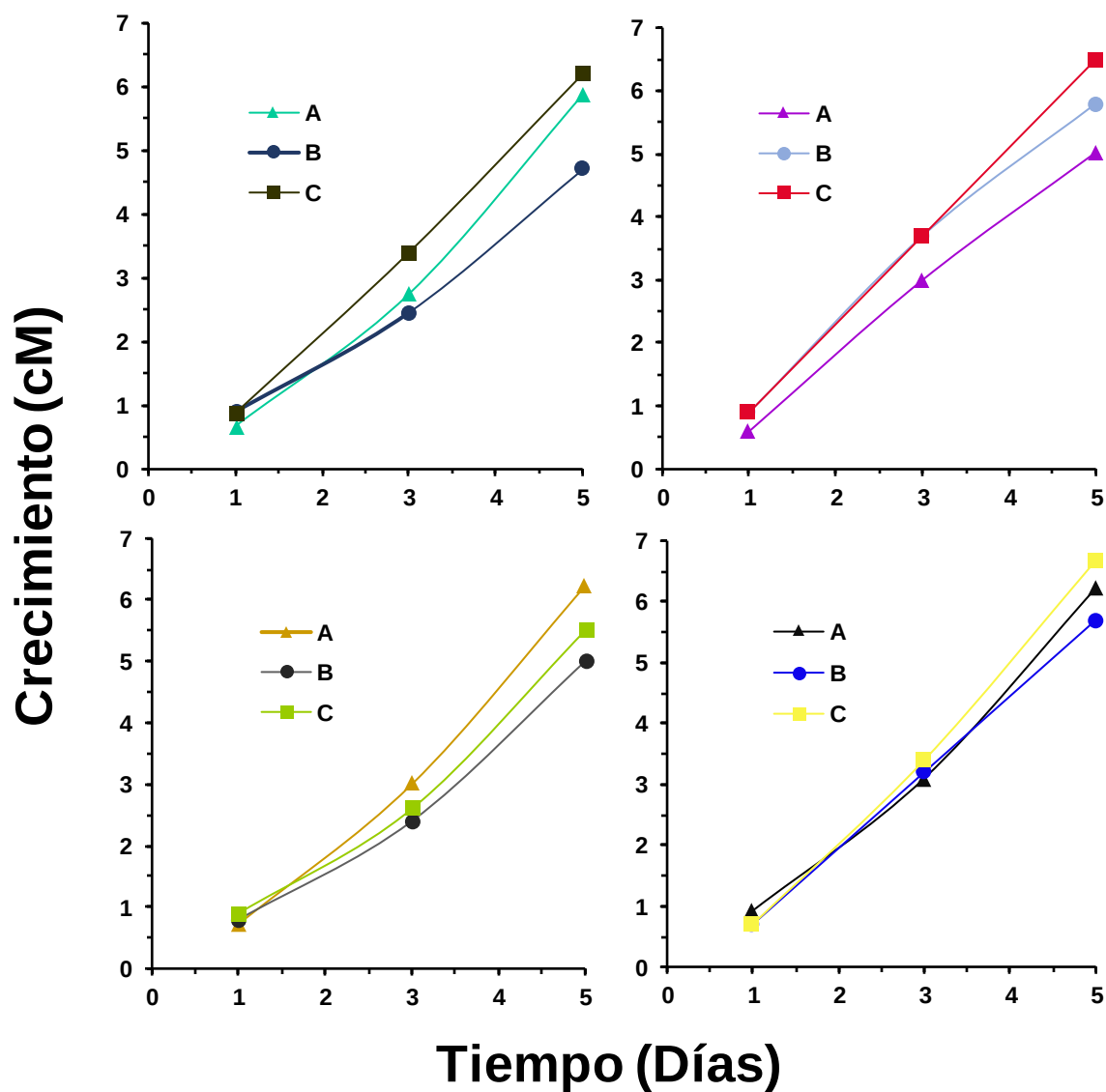


Figura 35. Crecimiento de las 4 cepas de *Trichoderma* sp. En PDA por 5 días a partir de conidios libres (A), conidios encapsulados (B) y conidios encapsulados con melaza (C).

g) Caracterización de los encapsulados

Tamaño y forma

Los encapsulados mostraron 2 tipos de formas al gelificarse, la primera fue una estructura esférica con bordes ligeramente irregulares, la segunda se asemeja a una lagrima con una base ligeramente esférica e irregular con circunferencias levemente aplanados y un extremo puntiagudo. El tamaño mostro diferencias Inter-tratamiento, lo cual se corrobora con el porcentaje de uniformidad de la tabla 6 y la

distribución de los tamaños de partícula, como se observa en las figuras 36 a 39, junto a su media en tamaño calculada en mm^2 . El porcentaje de uniformidad (U), germinación (G), pureza (Pu), valor de la media en tamaño (A), peso (P), y tasa de crecimiento micelial (TCM) se describen en el cuadro 5.

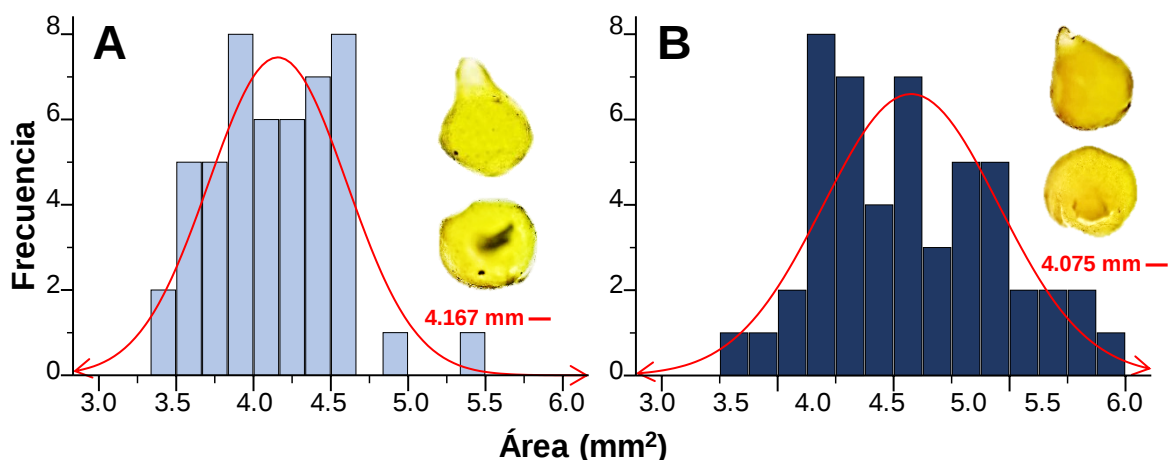


Figura 36. Distribución de tamaño de los encapsulados de *T. harzianum* THT4. A) encapsulados simples y B) encapsulados + melaza

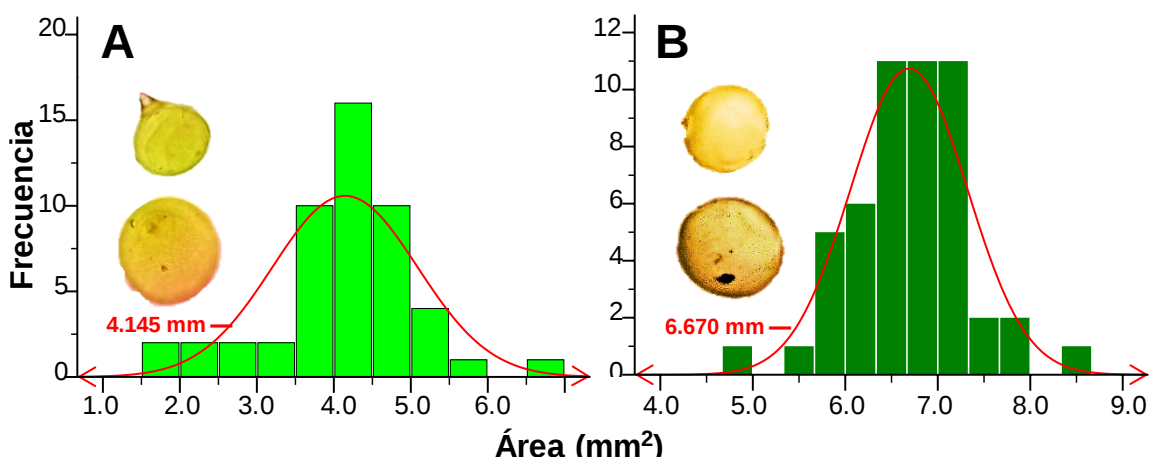


Figura 37. Distribución de tamaño de los encapsulados de *T. harzianum* TPS. A) encapsulados simples y B) encapsulados + melaza

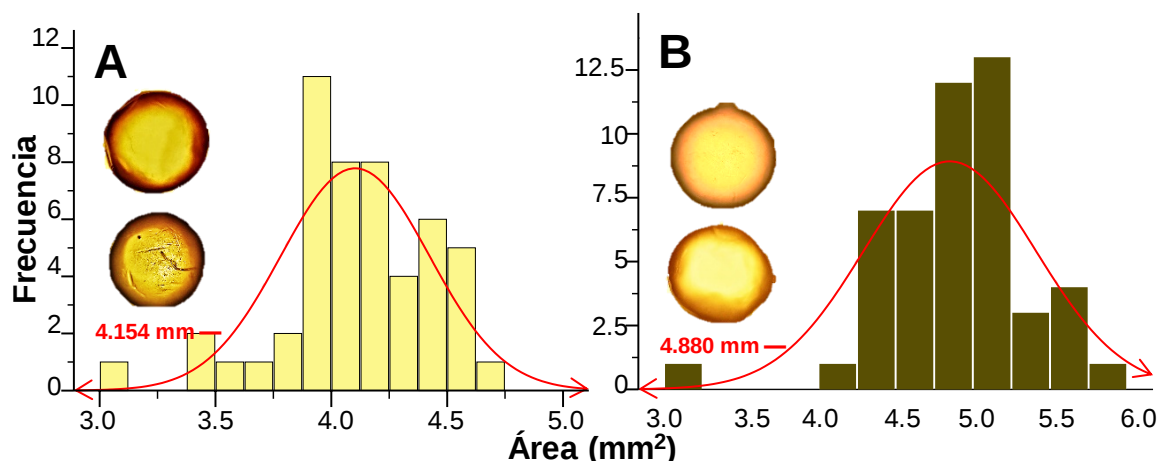


Figura 38. Distribución de tamaño de los encapsulados de *T. koningiopsis* M21. A) encapsulados simples y B) encapsulados + melaza

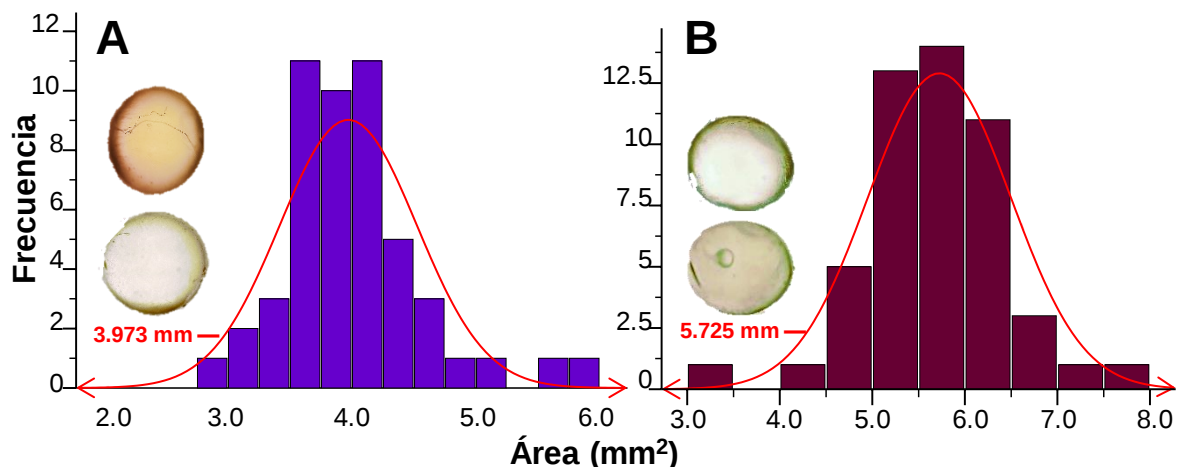


Figura 39. Distribución de tamaño de los encapsulados de *T. asperellum* T79. A) encapsulados simples y B) encapsulados + melaza

Tabla 6. Características generales del crecimiento de los encapsulados.

Tx	%U	%G	%Pu	A (mm ²)	P (mg)	TCM (cm/día)
BTH	62	100	100	4.167	13.7 ± 0.0002 ^a	0.931 ± 0.066 ^{cde}
BTHc	76	100	87	4.075	14.7 ± 0.0002 ^a	1.067 ± 0.025 ^{abc}
BTPS	56	100	100	4.145	9.7 ± 0.0002 ^b	1.019 ± 0.020 ^{bcd}
BTPSc	76	100	87	6.670	14.3 ± 0.0003 ^a	1.167 ± 0.024 ^a
BM21	84	100	87	4.154	14.5 ± 0.0002 ^a	0.833 ± 0.013 ^e
BM21c	74	100	87	4.880	14.7 ± 0.0001 ^a	0.917 ± 0.021 ^{de}
BT79	62	100	87	3.973	8.1 ± 0.0004 ^c	1.108 ± 0.008 ^{ab}
BT79c	70	100	87	5.725	9.3 ± 0.0003 ^{bc}	1.175 ± 0.016 ^a

Para las variables (eje; P y TCM), valores (media ± error estándar de 20 y 4 réplicas respectivamente) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

h) Fotoestabilidad

Concentración de UFC y Área de esporulación

El análisis del conteo de UFC demostró que los conidios libres (UFC-TH) de *T. harzianum* THT4 fueron los más afectados por la radiación UVc, ya que desde la primera hora en adelante mostraron diferencias significativas en su concentración de UFC/mL respecto de las demás horas y tratamientos. Los encapsulados simples (BTH) y enriquecidos con melaza (BTHc) mostraron un número mayor de UFC en todas las revisiones (figura 40), excepto a las 2.5 horas. Los valores más altos corresponden a los tratamientos de BTH y BTHc a las 0, 0.5 y 1 horas de irradiación. El AE también muestra una disminución respecto al tiempo de irradiación y conforme a los 3 tratamientos, el aspecto de las colonias después de 7 días posteriores a la irradiación para las horas 0 (control) y 2.5 (máximo tiempo de irradiación) se puede observar en la figura 41.

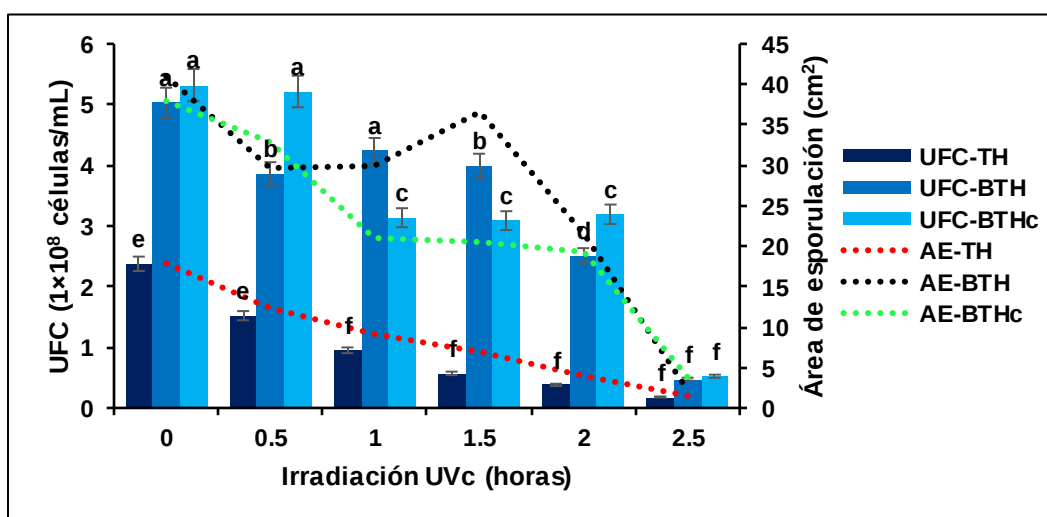


Figura 40. Cuantificación de UFC y área de esporulación de *T. harzianum* para conidios libres (TH) y encapsulados en partículas de alginato de calcio simples (BTH) y adicionados con melaza (BTHc), incubadas por 7 días después de someterlas a luz UVc por 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 horas.

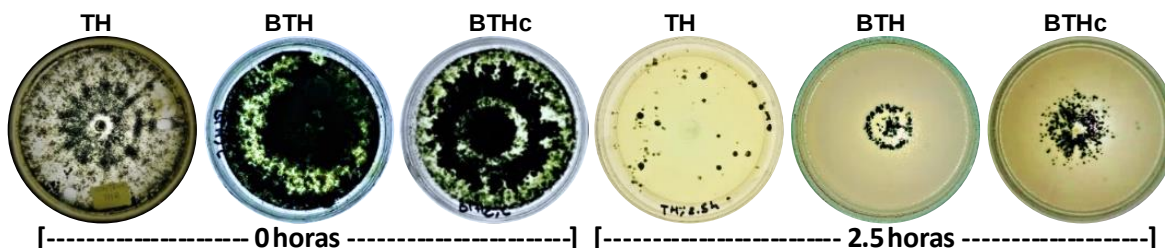


Figura 41. Aspecto de las colonias a los 7 días de incubación correspondientes a los tiempos 0 y 2.5 horas de irradiación UVc.

El análisis de las UFC de la cepa M21 de *T. koningiopsis* demostró una agrupación en 3 subconjuntos (a, b y c), denotando diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y entre las diferentes horas expuestos a la luz UVc. El valor más alto corresponde a los conidios libres (UFC-M21) de la hora “0”, inclusive se mostró superior a los controles de BM21 y BM21c, los cuáles no mostraron diferencias entre ellos dos al tiempo 0 (figura 42). El resto de tratamientos se agrupó en el subconjunto c el cual tuvo una concentración de UFC mínima expresándose similar desde la hora 0.5 de exposición, este fenómeno coincide con el AE que también mostro valores mínimos desde la hora 0 en adelante. Además, el aspecto de las colonias a la hora “0” es muy diferente en comparación con el aspecto de las colonias a la hora “2.5”, prácticamente no hay valor para el AE en ese tiempo (figura43) ya que solo se visualiza crecimiento micelial “vegetativo” y no has coloraciones que el software pueda identificar para la cuantificación de la AE.

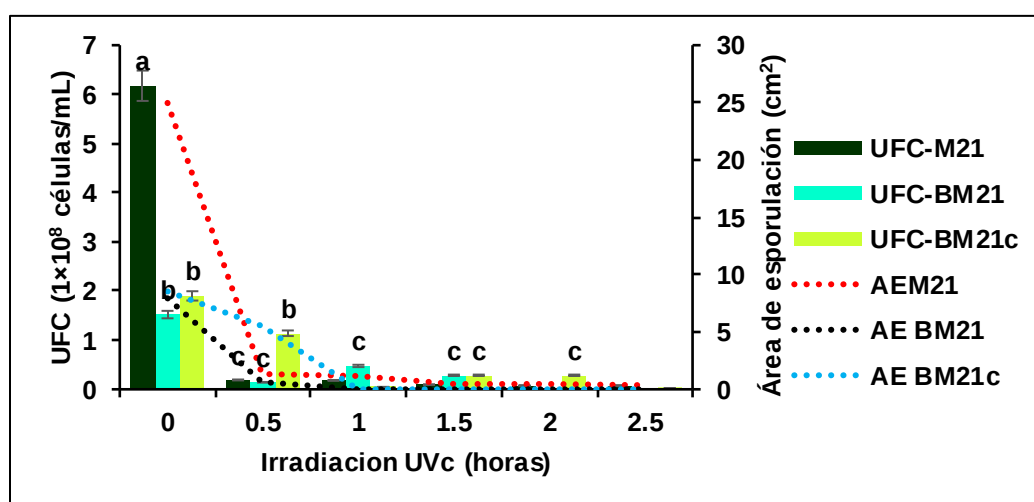


Figura 42. Cuantificación de UFC y área de esporulación de *T. koningiopsis* para conidios libres (M21) y encapsulados en partículas de alginato de calcio simples (BM21) y adicionados con melaza (BM21c), incubadas por 7 días después de someterlas a luz UVc por 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 horas.

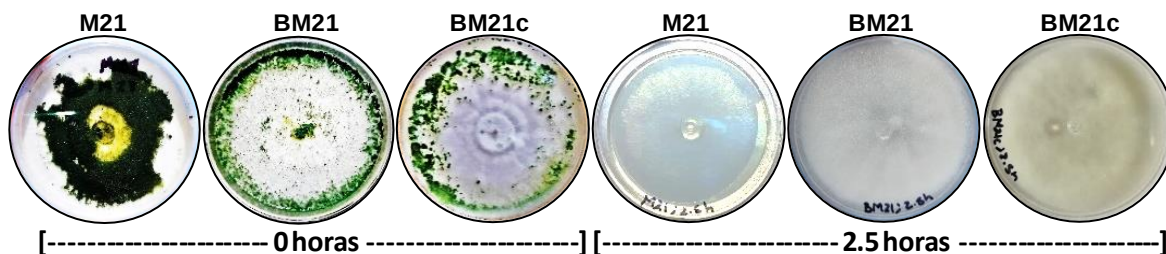


Figura 43. Aspecto de las colonias a los 7 días de incubación correspondientes a los tiempos 0 y 2.5 horas de irradiación Uvc.

El análisis de las UFC de la cepa TPS de *T. harzianum* demostró una agrupación en 5 subconjuntos (a, b, c, d y e), denotando diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y entre las diferentes horas expuestos a la luz UVc (figura 44). El grupo a presenta los valores más altos de UFC/mL desde la hora “0” hasta la hora “2” pertenecientes a los encapsulados enriquecidos con melaza, el resto de tratamientos muestra una disminución con respecto a los valores de AE y UFC/mL conforme se prolongó la irradiación. Los conidios libres y los encapsulados manifestaron una cinética de disminución similar, presentando los valores más bajos para la hora “2.5”. El aspecto de las colonias de las horas inicial “0” y final “2.5” muestran un patrón de crecimiento similar, excepto para la hora 2.5 de los conidios libres y el encapsulado simple, los cuales desarrollaron más micelio vegetativo en comparación con el encapsulado enriquecido al final del experimento.

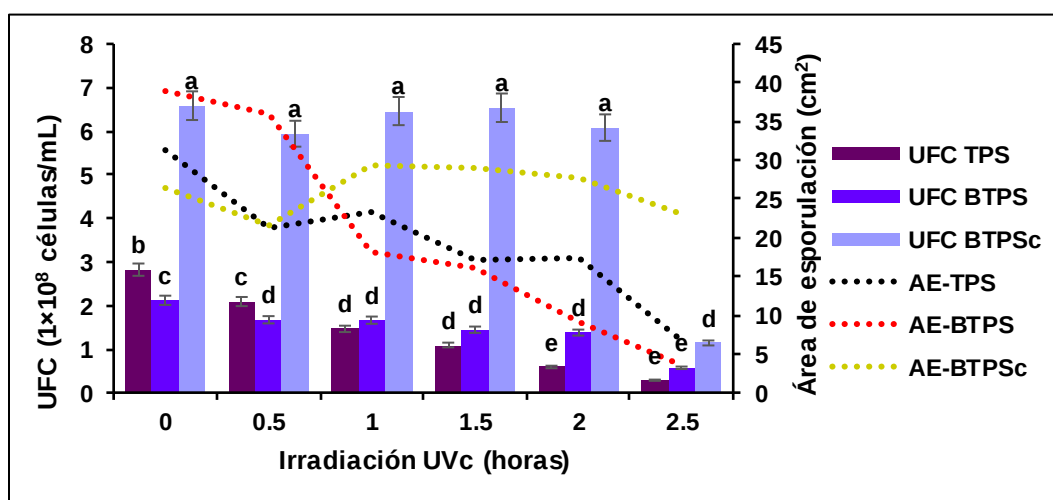


Figura 44. Cuantificación de UFC y área de esporulación de *T. harzianum* para conidios libres (TPS) y encapsulados en partículas de alginato de calcio simples (BTPS) y adicionadas con melaza (BTPSc), incubadas por 7 días después de someterlas a luz UVc por 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 horas.

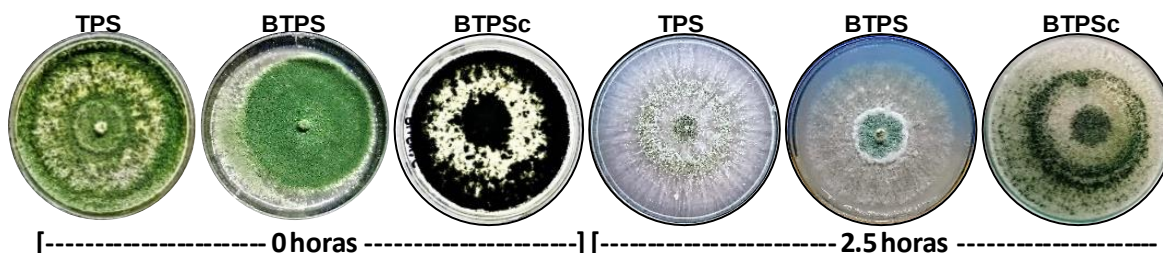


Figura 45. Aspecto de las colonias a los 7 días de incubación correspondientes a los tiempos 0 y 2.5 horas de irradiación UVc

El análisis de las UFC de la cepa T79 de *T. asperellum* demostró una agrupación en 5 subconjuntos (a, b, c, y d), denotando diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos y entre las diferentes horas expuestos a la luz UVc (figura 46). El valor más alto de UFC/mL pertenece a el tratamiento BT79c a la hora “0”, el resto de tratamientos muestra una disminución dramática, pues en el caso de los encapsulados simples su cinética de disminución tiene valores de 0 desde la hora “0.5” y para el caso de los conidios libres es desde la hora “1”. El aspecto de las colonias de las horas inicial “0” y final “2.5” muestran un patrón de crecimiento similar en los 3 casos, es decir “cero” indicios de esporulación para conidios libres, encapsulados simples y encapsulados enriquecidos con melaza (figura 47).

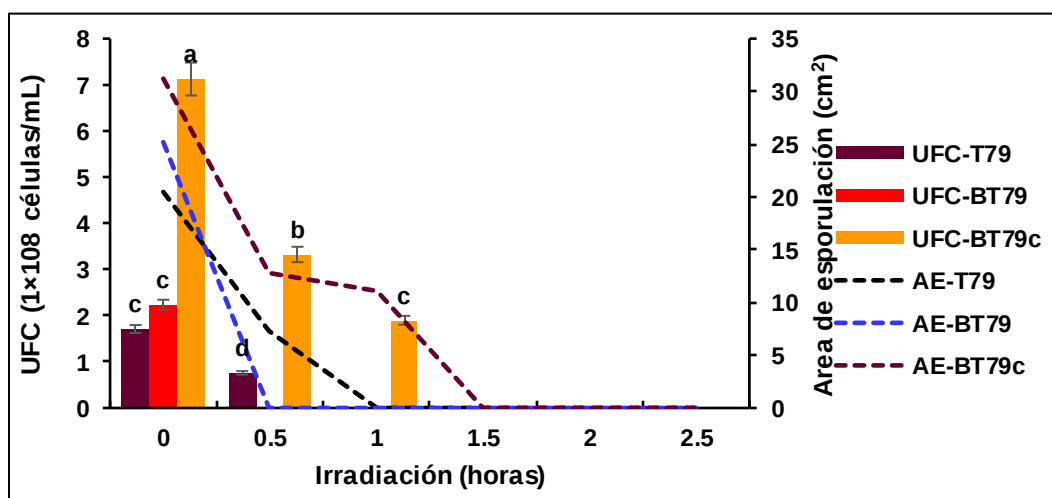


Figura 46. Cuantificación de UFC y área de esporulación de *T. asperellum* para conidios libres (T79) y encapsuladas en partículas de alginato de calcio simples (BT79) y adicionadas con melaza (BT79c), incubadas por 7 días después de someterlas a luz UVc por 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 horas.

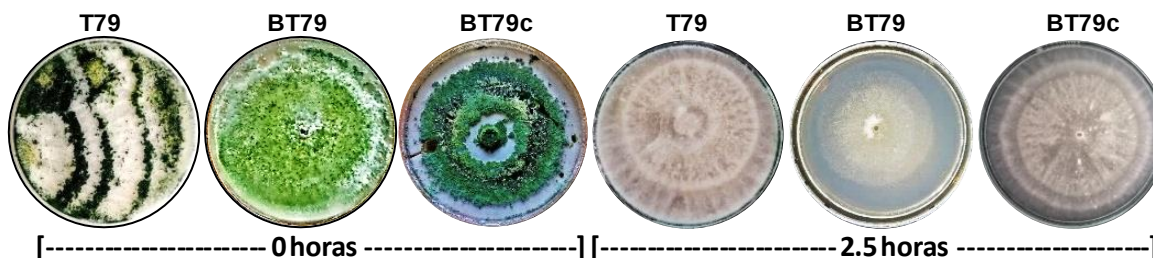


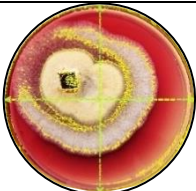
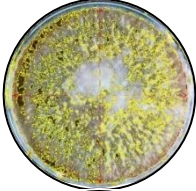
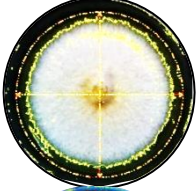
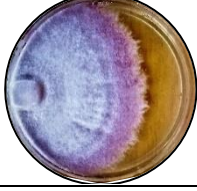
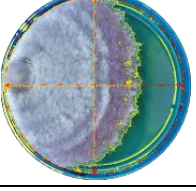
Figura 47. Aspecto de las colonias a los 7 días de incubación correspondientes a los tiempos 0 y 2.5 horas de irradiación UVc.

i) Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (PICM)

Cultivos duales

En la tabla 7 se muestran las áreas testigo que se usaron como valores de R1 en la fórmula de PICR, para cada hongo evaluado. En las figuras 48-50 se ilustran los distintos antagonismos promedio y su comparación mediante un gráfico de barras.

Tabla 7. Áreas promedio de los patógenos a las 240 horas de incubación.

Cepa	Imagen real	Imagen procesada	Área (cm ²)	Tcm (cm/día)
<i>Arcopilus aereus</i> MA-Aa20			37	0.268 ± 0.02
<i>Botrytis cinerea</i> MA-Bc20			63	0.694 ± 0.037
<i>Neurospora dictyophora</i> MA-Nd20			60	1.740 ± 0.144
<i>Fusarium solani</i> Ma-Fc120			54	0.361± 0.019
<i>Fusarium oxysporum</i> MA-Fc220			46	0.533 ± 0.039

Imágenes procesadas con el software PICSART y mediciones cuantificadas con ImageJ. *Diferentes letras en la columna de TCM (a, b, c y d) sobre la desviación estándar de la media muestras diferencias estadísticamente significativas para la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

El PICM que los encapsulados y conidios libres ejercieron sobre *Arcopilus aereus* difirieron estadísticamente entre los tratamientos, los valores más altos (arriba del 90%) se observaron en los tratamientos T79 y BT79 pertenecientes a conidios libres y encapsulados simples respectivamente, ambos de *T. asperellum*. Por otro lado, los valores más bajos fueron de los tratamientos BTP y TH pertenecientes a los encapsulados simples y enriquecidos de *T. harzianum* cepa TP y THT4 respectivamente (figura 48). El análisis post hoc de Tukey mostro diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de PICM y agrupo a los tratamientos en 5 subconjuntos homogéneos, donde el subconjunto ABC concentro la mayoría de los tratamientos los cuales están cerca del 90%. Los cultivos duales correspondientes se muestran en la figura 49.

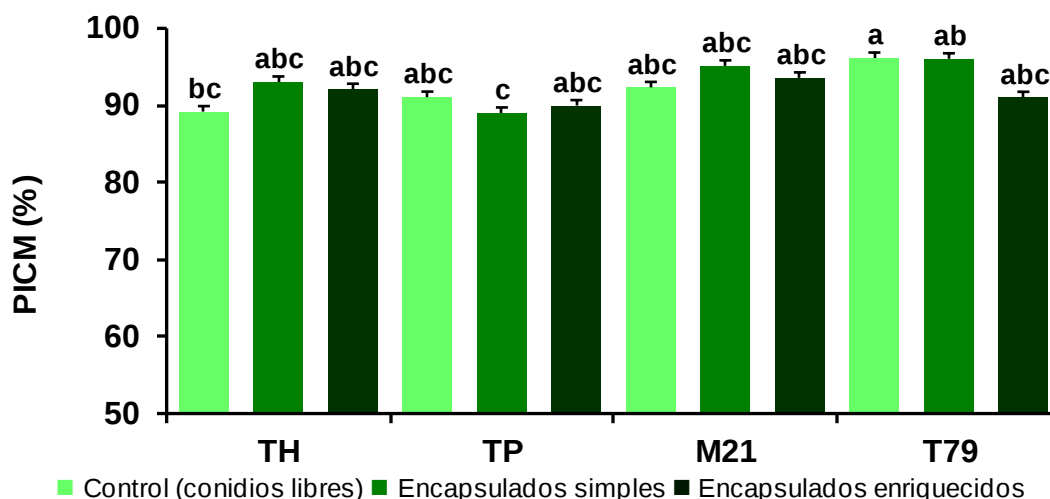


Figura 48. PICM registrado al día 10 de los encapsulados y conidios libres de las 4 especies de *Trichoderma* sobre *Arcopilus aereus*, letras distintas sobre las columnas difieren estadísticamente según la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

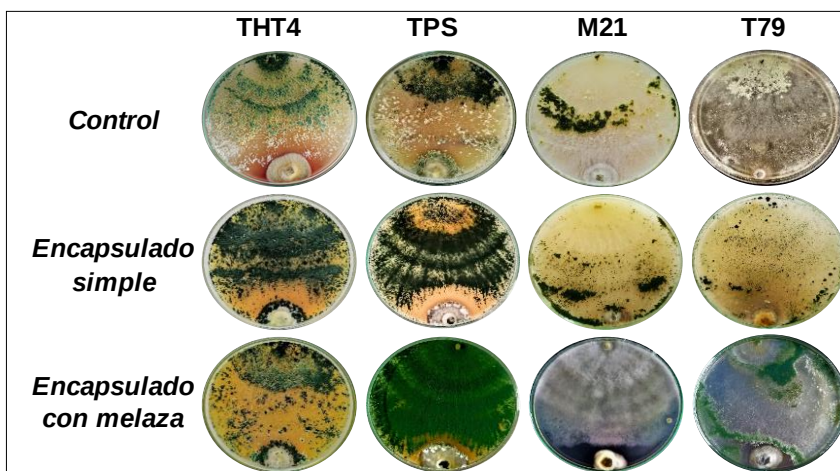


Figura 49. Cultivos duales de las 4 cepas de *Trichoderma* en condiciones de encapsulados y conidios libres frente a la cepa de *A. aereus*.

Los antagonismos observados de las cepas biocontrol sobre el fitopatógeno postcosecha *Botrytis cinerea* visualmente son satisfactorios, teniendo como media un PICM de 62.2 % por la cepa *T. harzianum* tht4, un 76.4 % para *T. harzianum* TP, un 76 % para *T. koningiopsis* M21 y un 87 % para *T. asperellum* T79. Del total de antagonismos valorados sobre *Botrytis cinerea*, los valores más altos fueron de *T. asperellum* control (86 %) y encapsulados enriquecido (94 %). Los cultivos duales correspondientes se muestran en la figura 51.

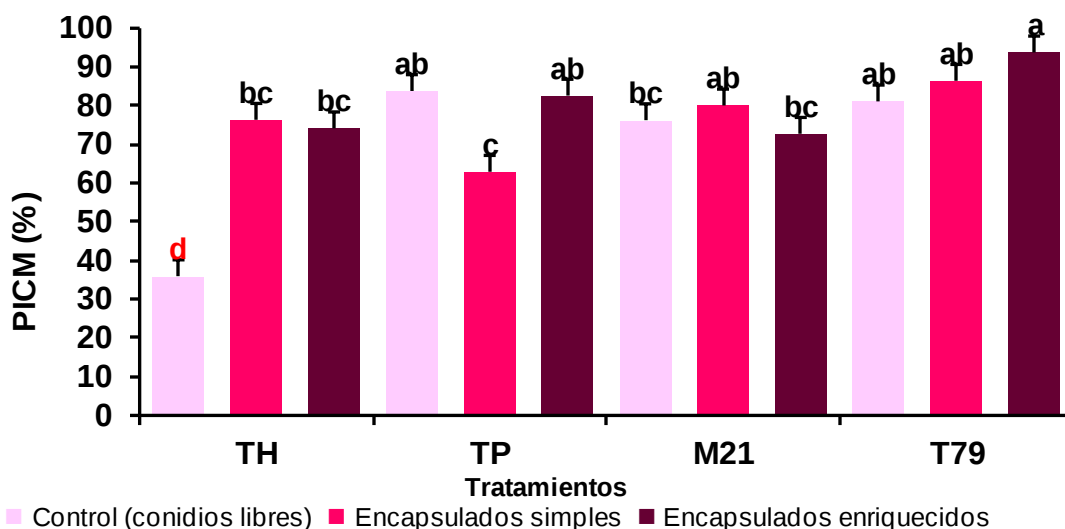


Figura 50. PICM registrado al día 10 de los encapsulados y conidios libres de las 4 especies de *Trichoderma* sobre *Botrytis cinerea*, letras distintas sobre las columnas difieren estadísticamente según la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

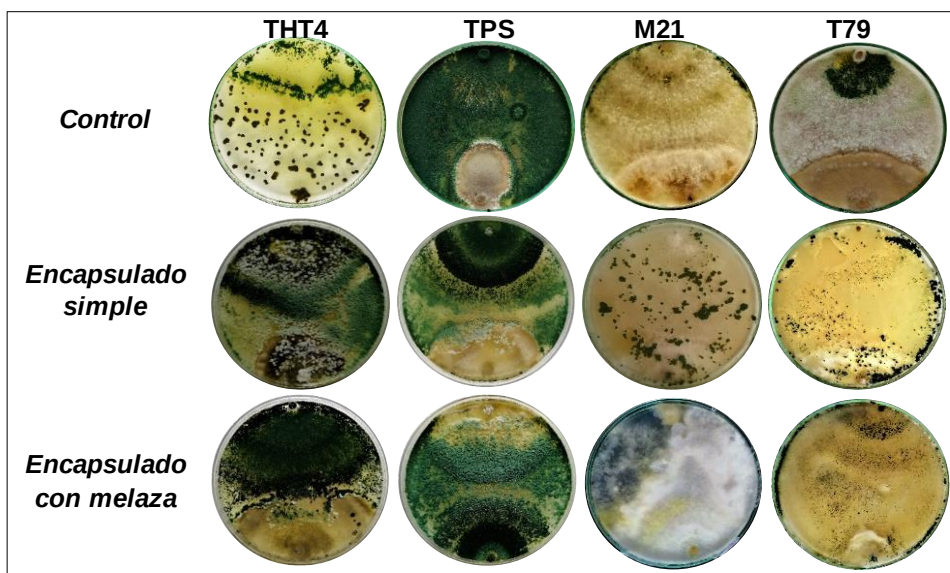


Figura 51. Cultivos duales de las 4 cepas de *Trichoderma* en condiciones de encapsulados y conidios libres frente a la cepa de *Botrytis cinerea*.

Los valores de PICM en los antagonismos sobre *Fusarium solani* MA-FC1 mostraron diferencias entre las 4 cepas de *Trichoderma* (figura 52). El valor más alto (94.2 %) fue del tratamiento BT79c correspondiente a conidios de *T. asperellum* encapsulados con melaza. Por lo contrario, el valor más bajo se observa en el tratamiento TP correspondiente a conidios libres de *T. harzianum* TPS. De forma general, los antagonismos inhibieron más del 60% el crecimiento del patógeno *F. solani* de la fresa. Los cultivos duales correspondientes a estos ensayos se muestran en la figura 53.

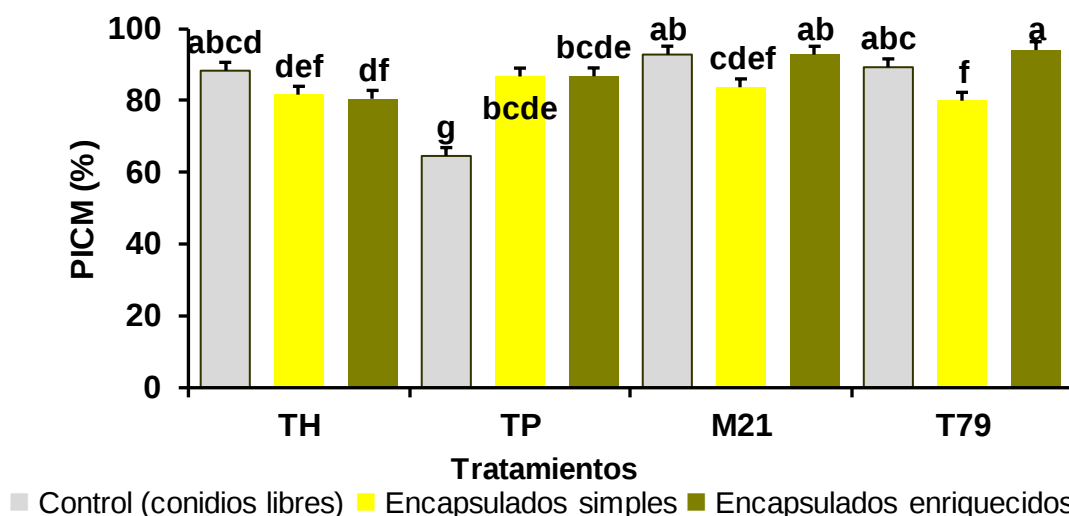


Figura 52. PICM registrado al día 10 de los encapsulados y conidios libres de las 4 especies de *Trichoderma* sobre *F. solani*, letras distintas sobre las columnas difieren estadísticamente según la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

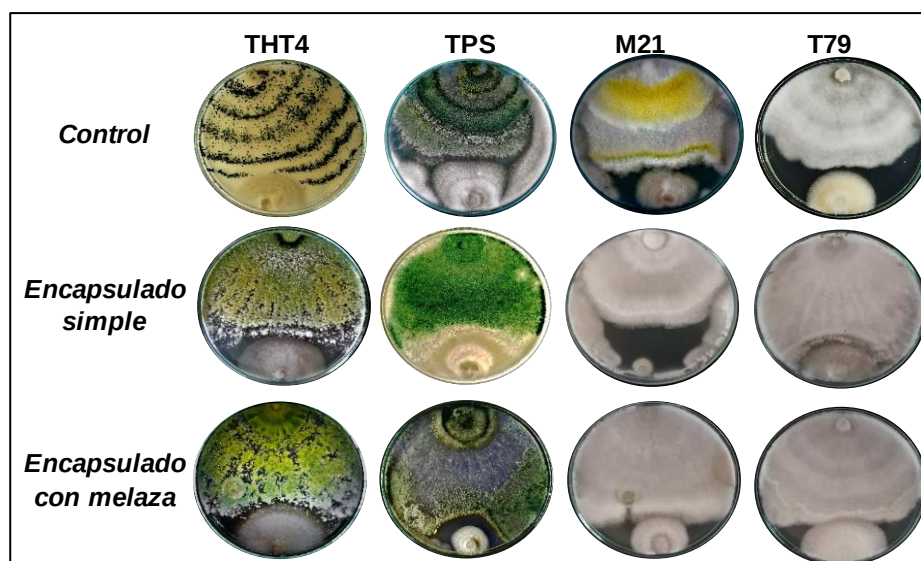


Figura 53. Cultivos duales de las 4 cepas de *Trichoderma* en condiciones de encapsulados y conidios libres frente a la cepa de *F. solani*.

La cepa de *F. oxysporum* se vio más afectada en el cultivo dual por los conidios libres de *T. harzianum* presentando un 92.15 % como promedio en sus ensayos de antagonismo, caso muy contrario a lo sucedido con los mismos conidios encapsulados y enriquecimiento de las capsulas con melaza, pues la diferencia es significativa, teniendo como promedio un PICM de 60.03 %. Resultados similares se vieron reflejados contra el biocontrolador *T. asperellum* con 78.41, 81.90 y 78.96 % para conidios libres, encapsulados simples y encapsulados enriquecidos respectivamente. Los cultivos duales correspondientes a estos ensayos se muestran en la figura 55.

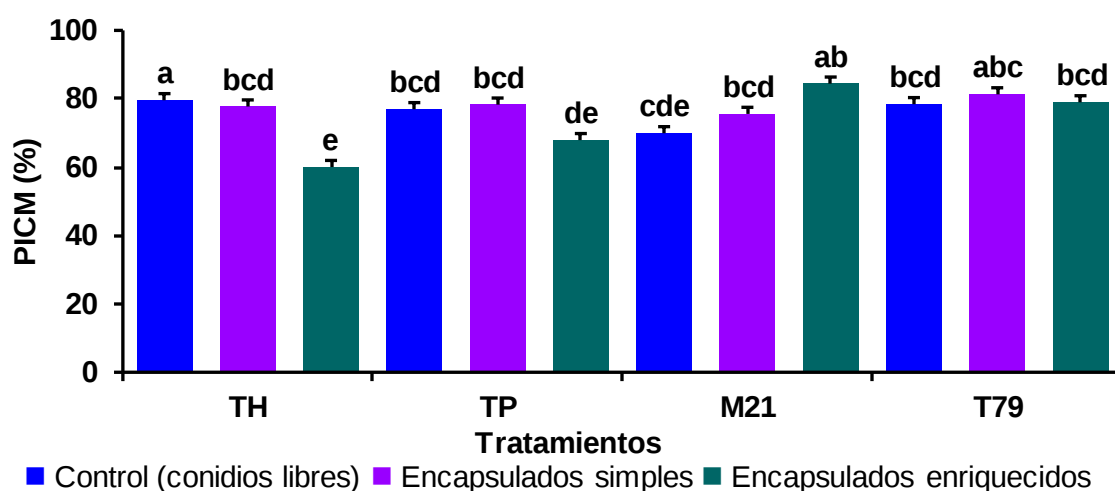


Figura 54. PICM registrado al día 10 de los encapsulados y conidios libres de las 4 especies de *Trichoderma* sobre *F. oxysporum*, letras distintas sobre las columnas difieren estadísticamente según la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

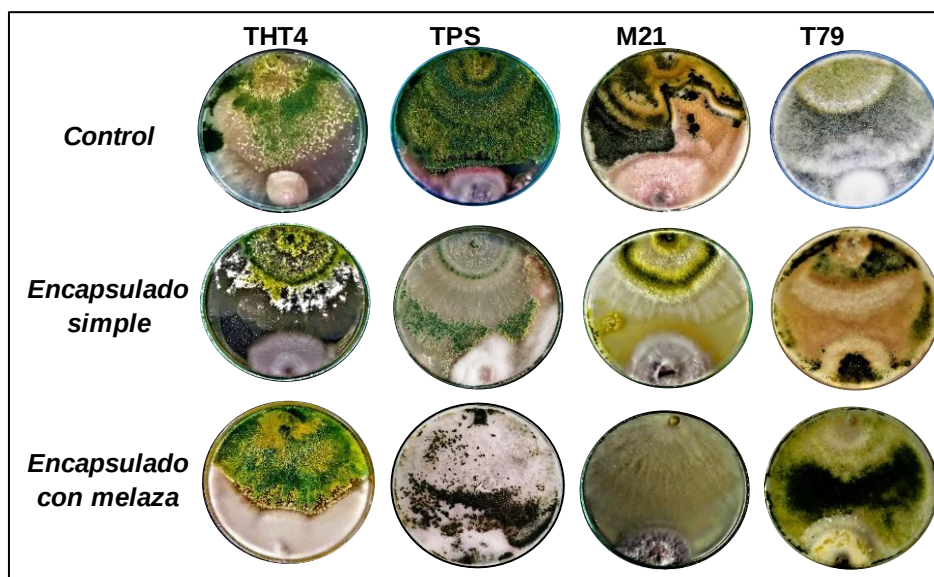


Figura 55. Cultivos duales de las 4 cepas de *Trichoderma* en condiciones de encapsulados y conidios libres frente a la cepa de *F. oxysporum*.

Respecto al último fitopatógeno, el *Neurospora dictyophora* mostro una variabilidad mayor a los otros fitopatógenos, los valores más bajos para el PICM fueron con los tratamientos de BTP (19.93 %), BT79c (22.08%) y BTH (28.90%). Contrario a los tratamientos control de cada tratamiento antes mencionado. El valor más alto fue mostrado por el tratamiento control T79 con un 71.04 %. Los cultivos duales correspondientes a estos ensayos se muestran en la figura 57.

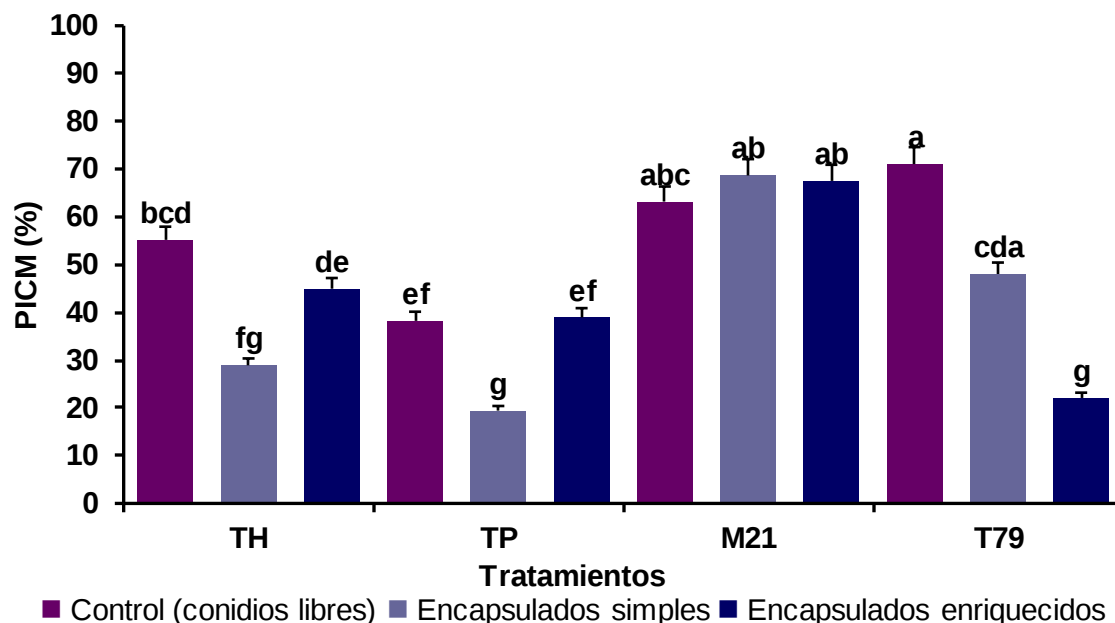


Figura 56. PICM registrado al día 10 de los encapsulados y conidios libres de las 4 especies de *Trichoderma* sobre *N. dictyophora*, letras distintas sobre las columnas difieren estadísticamente según la prueba HSD Tukey con $p \leq 0.05$.

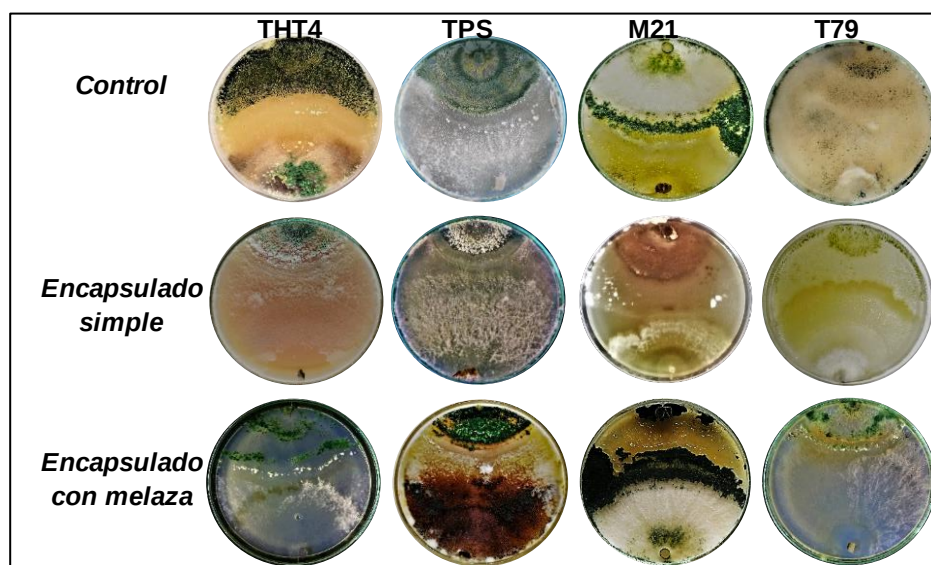


Figura 57. Cultivos duales de las 4 cepas de *Trichoderma* en condiciones de encapsulados y conidios libres frente a la cepa de *N. dictyophora*.

j) Categorías de los antagonismos

La clasificación categórica de los antagonismos (figura 58) muestra que los ensayos sobre *Neurospora dictyophora* se clasifican en los niveles del 3 al 5, es decir que los agentes de control biológico inhiben el crecimiento de forma deficiente y mala a este fitopatógeno, exceptuando los tratamientos correspondientes a *T. koningiopsis* los cuales se clasificaron como antagonismos de escala 2, es decir que son buenos antagonismos. Otro resultado de escala 4 o deficiente es el de los conidios libres de *T. harzianum* sobre *Botrytis cinerea*, en comparación con los tratamientos restantes que caen en la categoría 1 y 2, las cuales representan antagonismos muy bueno y bueno respectivamente. El resto de antagonismos sobre los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Arcopilus aereus* recaen en las categorías 1 y 2.

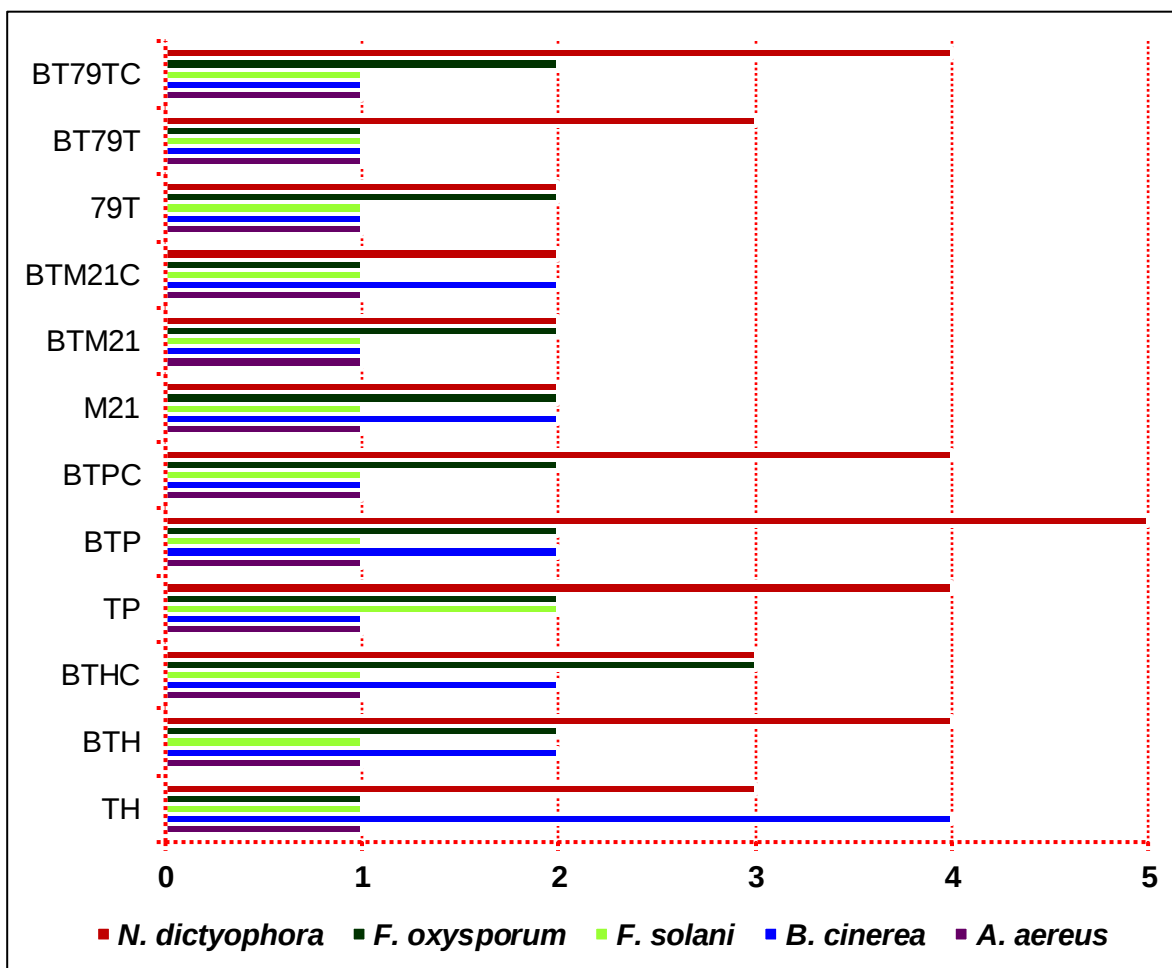


Figura 58. Clasificación categórica de los antagonismos según Bell et al., 1982.

Tipo de antagonismos

De los 5 tipos de antagonismos descritos por Porter (1923), el tipo inhibición leve fue el que se presentó más en los antagonismos del estudio con un 33% del total de resultados (figura 59), este tipo de confrontamientos se caracteriza por que las colonias fúngicas evaluadas se encuentran en punto y detienen la invasión micelial. otros porcentajes destacables son los de 27 y 25 % que corresponden a los tipos de antagonismos crecimiento alrededor y sobrepuestos, de los cuales el segundo tiene más posibilidades de colonizar por completo la colonia del patógeno confrontado. El tipo de antagonismo “inhibición a distancia” se presentó solo en un 10 % de los ensayos, este tipo de confrontamientos es muy peculiar, ya que por lo general la colonia del patógeno no crece demasiado, pero comienza a detener el crecimiento del hongo antagonístico, este tipo de antagonismo solo se dio en los confrontamientos que se ejercieron sobre el fitopatógeno de raíz *F. solani*.

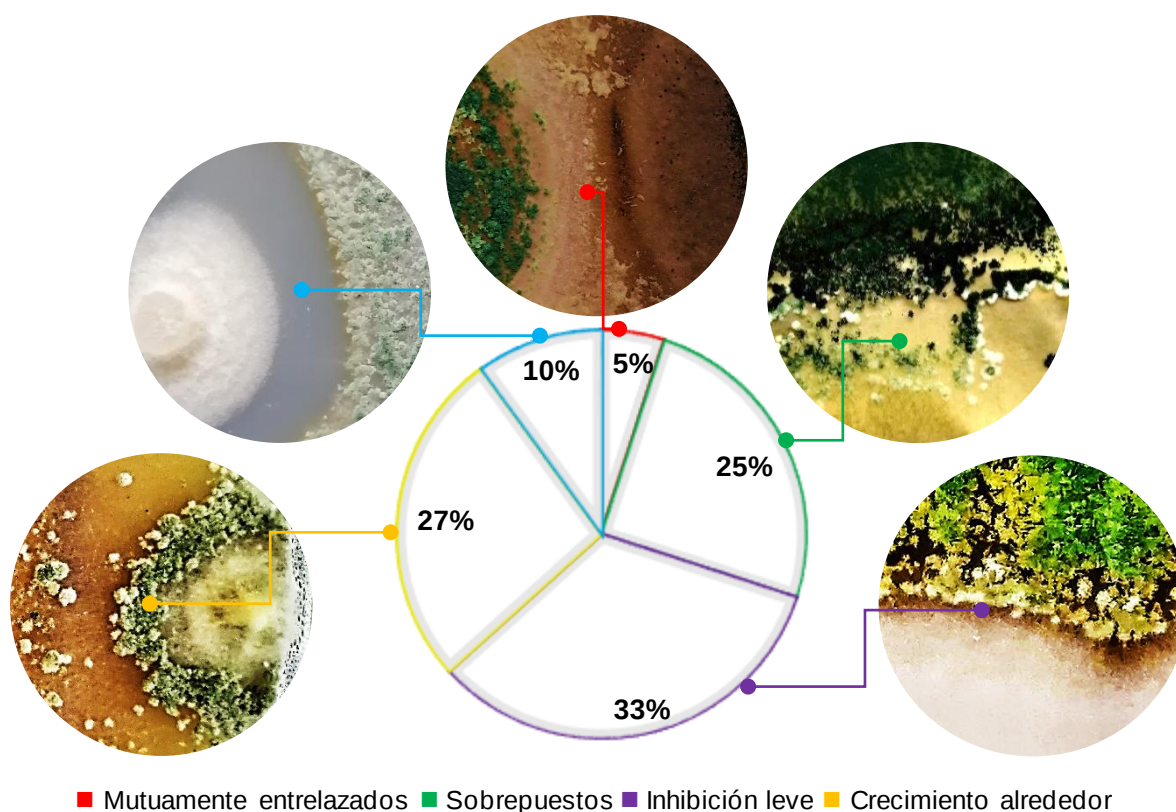


Figura 59. Porcentajes de los tipos de antagonismos observados en el estudio según Porter (1923).

9. DISCUSIÓN

La discusión se expresa en 2 partes debido a la naturaleza del trabajo, en el primer apartado se discute acerca de la identificación de los hongos asociados al cultivo y sus respectivos resultados sobre el confrontamiento contra las 4 cepas de *Trichoderma* sp., y sus 3 diferentes presentaciones empleadas en ese trabajo. Enseguida, el segundo apartado hace énfasis en la discusión acerca de los resultados sobre la caracterización de los encapsulados y de la fotoestabilidad mostrada durante la evaluación de sensibilidad al estrés lumínico ejercido sobre los distintos tratamientos.

a) Identificación y caracterización morfológica, molecular y patogénica de los hongos aislados del cultivo y su respectivo PICM

En este estudio se caracterizaron 5 aislados a partir de distintos tejidos de fresa. Los datos de patogenicidad indican que los signos y síntomas observados en campo corresponden a la infección ocasionada por algunos hongos evaluados en este estudio. La cepa MA-Aa20 se identificó como *Arcopilus aereus*, sus características morfométricas y moleculares concuerdan con lo reportado por Wang *et al.* (2016). Para este hongo no se cumplieron los postulados de Koch, por ende, se descarta su rol como fitopatógeno, pero si se considera que su presencia en el cultivo puede deberse a una relación endofítica tal y como la tienen los hongos de esta especie con plantas de uva (*Vitis vinifera*) (Dwibedi y axena 2018). Los datos de los antagonismos muestran como la especie de *A. aereus* es inhibido hasta un 90% en promedio por todos los tratamientos, y los antagonismos observados son de tipo “crecimiento alrededor”, estos datos se relacionan con la media de su tasa de crecimiento micelial la cual presenta los valores más bajos entre los hongos analizados en este estudio.

Los 4 hongos restantes dieron como positivo a los postulados de Koch, por lo que el tipo de relación con el cultivo de fresa es considerado de patógeno-huesped. Sin embargo, su asociación difiere en cuanto al tipo de tejido asociado.

Las características morfológicas de MA-Fc1 y MA-Fc2 corresponden a las especies de *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* concordando con las caracterizaciones publicadas por Chehri *et al.* (2015) y Gordon *et al.* (2015). Las cepas de *Fusarium* sp., mostraron su relación sobre los tejidos de raíz, afectando en gran medida el funcionamiento de estas, según lo visto durante las pruebas de patogenicidad, estos resultados concuerdan con lo reportado por Henry *et al.* (2017) y Villarino *et al.* (2019) para *F. oxysporum* y *F. solani* respectivamente. Ambas especies de *Fusarium* sp., presentaron variabilidad en cuanto al PICM ejercido por los agentes de biocontrol durante las pruebas de antagonismo, la cepa MA-FC2 de *F. oxysporum* presentó los valores más altos de inhibición por los tratamientos TH, BT79t y BTM21c, los cuales se clasifican como antagonismos de categoría 2 en la escala de Bell *et al.* (1982) y en su mayoría de tipo "inhibición leve", resultados similares se mencionan por Rubio-Tinajero *et al.* (2021) y Andrade-Hoyos *et al.* (2019). Los antagonismos sobre *F. solani* MA-FC1 mostraron valores de PICM arriba del 70%, lo cual corresponde a la escala 1 en la clasificación de antagonismo y tipo "inhibición a distancia", estos datos empatan con lo mencionado por Suárez *et al.* (2008) pero difieren con lo reportado por Jagraj *et al.* (2018), Michel-Aceves *et al.* (2019) y Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), quienes reportan valores menores a los observados en este estudio, sus valores de PICM corresponden a un 50 a 60% de inhibición sobre el fitopatógeno.

La cepa de *B. cinerea* dio como positivo a los postulados de Koch para la infección en fruto y tejido foliar de la fresa, estos resultados corroboran la capacidad del hongo como fitopatógeno tipo necrótrofo, tal y como lo afirman Hyde *et al.* (2014) y Zhou *et al.* (2014). Los antagonismos evidenciaron la capacidad de inhibición de las 4 cepas de *Trichoderma* sp., al inhibir de forma general un 75% el desarrollo *in vitro* del fitopatógeno, dichos valores se agrupan en la categoría 2 y 1 según las clases establecidas por Bell *et al.* (1982). Los tipos de antagonismos observados

durante los ensayos de antagonismo fueron “sobrepuestos” y “crecimiento alrededor”. Los resultados de PICM concuerdan con lo publicado por Kuzmanovska *et al.* (2018) quien obtuvo resultados de inhibición superiores para la especie de *T. asperellum* en comparación con la cepa de *T. harzianum* que evaluó en su trabajo, el mismo fenómeno se observó en el actual estudio, debido a que los valores más altos de PICM se observaron en los tratamientos BT79c, BT79 y T79 correspondientes a encapsulados enriquecidos, encapsulados simples y conidios libres de la especie *T. asperellum*. La cepa de *Neurospora dictyophora* dio positivo a los postulados de Koch como agente causal de la pudrición del fruto y su infección está mediada por heridas y condiciones de temperatura preferiblemente no menores a 30 °C. A la fecha no se han encontrado reportes para este hongo como fitopatógeno en fresa. Sin embargo, su presencia puede deberse a la escasa ventilación y aumento de temperatura (40 °C) óptimas para el desarrollo y propagación de *N. dictyophora* (Selker, 2017), además McCluskey y Baker (2017), mencionan a las especies de *N. crassa*, como organismos competentes para la rápida degradación de la pared celular vegetal. Si bien, el estilo de vida de los hongos pertenecientes al género *Neurospora* aún sigue bajo investigación para entender su asociación con las plantas vivas (Gladieux *et al.*, 2015), existe evidencia de especies como *N. crassa* que pueden fungir como patógeno sobre plántulas de pino silvestre (*Pinus sylvestris*) y como un organismo endófito en plantaciones artificiales de *Acer ginnala* (*Amur Maple*) en el noreste de China (Qi *et al.*, 2012). En complemento, Galagan *et al.* (2003), mencionan que la secuencia del genoma de *Neurospora* sp., contiene numerosos genes necesarios para la patogénesis de las plantas identificados en patógenos fúngicos, además, de que contiene todos los componentes de transducción de señales implicados en la patogénesis de los ascomicetos que se han descrito hasta ahora. A nuestro entender este es el primer informe de pudrición de frutos de fresa causados por *N. dictyophora* en México. Los resultados de los antagonismos sobre *N. dictyophora* presentaron más variabilidad respecto a los otros hongos fitopatógenos evaluados, pues se observaron valores de PICM desde 19.93 hasta 71.04 %, los cuales se consideran valores deficientes y regulares respectivamente y de acuerdo a las categorías de antagonismos. Los

valores más altos se obtuvieron para los tratamientos T79 (conidios libres de *T. asperellum*), BM21 (encapsulado simple de *T. koningiopsis*) y BM21c (encapsulado enriquecido de *T. koningiopsis*), en base a estos datos se sugiere seguir buscando cepas de agentes de biocontrol que aumenten el PICM sobre este fitopatógeno, de igual forma se recomienda usar otros tipos de microorganismos no solo hongos antagonicos.

b) Efecto de protección ejercido por la encapsulación sobre las cepas de *Trichoderma* sp.

La encapsulación de *Trichoderma* sp., afecta de forma directa el desarrollo micelial de las cepas per se, esto se sostiene tras la comparación de la TCM entre tratamientos, siendo los encapsulados enriquecidos los que presentan valores más altos para la TCM en comparación con sus controles, al menos para las cepas THT4, TPS y T79. Por ende, se considera este efecto como el primer aspecto positivo directo sobre el desarrollo normal de las cepas de *Trichoderma* sp., en condiciones *in vitro*. El tamaño y peso de las biopartículas mostró un ligero aumento en los encapsulados que están enriquecidos con melaza. La variabilidad de puede deber a la metodología usada para la encapsulación, no obstante, se observó de forma general un tamaño de partícula promedio de 4.72 mm² y un peso de 12.37 mg. En cuanto a las fotoestabilidad también se denotó cierta variabilidad entre tratamientos, siendo las cepas Tht4 y TPS de *T. harzianum* las que mejor se desarrollaron después de la irradiación UV, resultados similares se mencionan por Maruyama *et al.* (2020). Entre los tratamientos destaca el de BTPSc ya que mostró el valor más alto durante el conteo de UFC/mL en el periodo de irradiación desde las “0” hasta “2 horas” en comparación con las demás cepas inclusive contra su control (conidios libres) y el encapsulado simple. *T. asperellum* y *T. koningiopsis* mostraron resultados muy desfavorables respecto a su capacidad de producción de UFC posteriores a la irradiación prolongada. Si bien, la fotoestabilidad de biopartículas es un campo que sigue en estudio y por ello su evaluación aún sigue concretándose, es importante señalar que el principal efecto de la irradiación UV sobre el desarrollo

de hongos *in vitro* se ha documentado como un impacto negativo o de mutagénesis simple, principalmente se asocia negativamente con la tasa de supervivencia de las esporas (Alfiky, 2019) lo cual podría explicar por las cepas de *T. koningiopsis* y *T. asperellum* tuvieron los valores más bajos y nulos respecto al conteo de esporas y el área de esporulación en el actual estudio. La principal recomendación para la continuidad de la investigación sería enriquecer los encapsulados con otras fuentes de carbono y al mismo tiempo disminuir la variabilidad respecto a tamaño de las biopartículas y, por último, hacer experimentos donde se prueben las biopartículas irradiadas en ensayos duales contra fitopatógenos *in vitro* o en sistemas tripartitas *in situ*, contemplando la planta de fresa y sus diversos fitopatógenos en suelo.

10. CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro estudio indicaron que las 4 especies de *Trichoderma* sp., analizadas responden de forma similar en cuanto a su desarrollo *in vitro*. Sin embargo, los datos de fotoestabilidad indicaron variabilidad en cuanto a su capacidad de generar UFC después de ser sometidas al estrés lumínico, lo cual afectó de forma grave a las cepas M21, T79 y TPS. Los resultados de PICM de forma general son buenos y muy buenos según la clasificación categórica empleada en el estudio, excepto, los resultados obtenidos a través de los ensayos sobre la especie *N. dictyophora*, con estos datos junto a las pruebas de patogenicidad, se obtuvo evidencia de *N. dictyophora* como agente causal de la pudrición de frutos en bajo condiciones de temperatura superiores a 30° C.

11. REFERENCIAS

- Ahmed, R., Gondal, A. S., Khan, M. T., Shahzaman, S., & Hyder, S. (2018). First Report of *Botrytis cinerea* Causing Gray Mold Disease on Peach from Pakistan. *International Journal of Phytopathology*, 7(3), 131-131.
- Ajwa, H. & Othman, M. (2013) Allyl isothiocyanate and dimethyl disulfide for strawberry production. 2013 Proceedings of Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. San Diego (CA), pp 3-1.
- Alfiky, A. (2019). Effects of ultraviolet irradiation on the in vitro antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against soil-borne fungal pathogens. *Heliyon*, 5(7), e02111.
- Dwivedi, V., & Saxena, S. (2018). *Arcopilus aureus*, a resveratrol-producing endophyte from *Vitis vinifera*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186(2), 476-495.
- Ali Anwar, M. B. (2018). Integrated Management of Fungal Diseases in Strawberry. *Chemical Science Review and Letters*, 233-236.
- Amiri, A., Onofre, R. B., & Peres, N. A. (2016). First report of gray mold caused by *Botryotinia ricini* (*Amphobotrys ricini*) on strawberry in United States. *Plant Disease*, 100(5), 1007.
- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., & Barrales-Cureño, H. J. (2019). Antagonism of *Trichoderma* spp. vs fungi associated with wilting of chilli. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1259-1272.
- Ansary, J., & Cianciosi, D. (2020). Natural antioxidants: Is the research going in the right direction. *Metabolism*, 13(3), 187-191.
- 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), 305-315.
- Bartosz, G., & Sadowska-Bartosz, I. (2015). Oxidative, nitrosative, and chlorinative stress: biomarkers. In *Studies on Psychiatric Disorders* (pp. 1-39). Humana Press, New York, NY.
- Battino, M. (2020). Strawberry bioactive compounds and human health: The exciting story of an unbelievable bet.
- Bi, Y., Guo, W., Zhang, G. J., Liu, S. C., & Chen, Y. (2017). First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Strawberry in China. *Plant Disease*, 101(5), 832-832.
- Castillo Tovar, J. (1987). *Micología general*.

Chehri, K., Salleh, B., & Zakaria, L. (2015). Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. *Microbial ecology*, 69(3), 457-471.

Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*—Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens*, 9(11), 923.

Chughtai, S., Abbasi, N. A., Qureshi, K. M., Qureshi, A. A., & Qureshi, U. S. Impact of organic fertilizers on strawberry production grown in soilless media.

Chung, P. C., Wu, H. Y., Ariyawansa, H. A., Tzean, S. S., & Chung, C. L. (2019). First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. *Plant Disease*, 103(7), 1775.

Cosseboom, S. D., Ivors, K. L., Schnabel, G., & Holmes, G. J. (2018). First report of *Botrytis mali* causing gray mold on strawberry in California. *Plant Disease*, 102(3), 679.

Darrow, G. M. (1966). *The Strawberry*. The Strawberry.

Daugovish, O., Fennimore, S., Koike, S., Gordon, T., Muramoto, J., Shennan, C. & Subbarao, K. (2013) Non-fumigant treatments for management of *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina* on strawberry cultivar San Andreas. 2013 Proceedings of Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. San Diego (CA), pp 18-1 to 18-4.

Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiology spectrum*, 5(1), 5-1.

Domínguez, P., Miranda, L., Soria, C., de los Santos, B., Chamorro, M., Romero, F., & Medina, J. J. (2014). Soil biosolarization for sustainable strawberry production. *Agronomy for sustainable development*, 34(4), 821-829.

Duniway, J.M. (2002). Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant Fumigation of soil. *Phytopathol.* 92, 1337-1343. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.12.1337.

Dwibedi, V., & Saxena, S. (2018). *Arcopilus aureus*, a resveratrol-producing endophyte from *Vitis vinifera*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 186(2), 476-495.

Emoghene, A. O., & Futughe, A. E. (2016). Fungi as an alternative to agrochemicals to control plant diseases. In *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology* (pp. 43-62). Springer, Cham.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Forero, R., Ortiz, E., de León, W., Gómez, J. C., & Hoyos-Carvajal, L. (2015). Analysis of resistance to *Fusarium oxysporum* in *Passiflora maliformis* L. plants. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(2), 197-208.

Galagan, J., Calvo, S., Borkovich, K. *et al.* La secuencia del genoma del hongo filamentoso *Neurospora crassa*. *Nature* 422, 859–868 (2003). <https://doi.org/10.1038/nature01554>

Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Henry, P. M., Kong, M., & Broome, J. C. (2016). First report of a wilt disease of blackberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease*, 100(5), 1018-1018.

Guilger, M., Pasquoto-Stigliani, T., Bilesky-Jose, N., Grillo, R., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F., & Lima, R. D. (2017). Biogenic silver nanoparticles based on *Trichoderma harzianum*: synthesis, characterization, toxicity evaluation and biological activity. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.

Gupta, D. R., Kabir, M. K., Hassan, O., Sabir, A. A., Mahmud, N. U., Surovy, M. Z., ... & Islam, M. T. (2019). First Report of Anthracnose Crown Rot of Strawberry Caused by *Colletotrichum siamense* in Rajshahi District of Bangladesh. *Plant Disease*, 103(3), 580-580.

Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G., & Valent, B. (1988). A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science*, 239(4837), 288-290.

Hansen, C., & Maule, A. F. (1973). Pehr Osbeck's collections and Linnaeus's *Species plantarum* (1753). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 67(3), 189-212.

Henry, P. M., Kirkpatrick, S. C., Islas, C. M., Pastrana, A. M., Yoshisato, J. A., Koike, S. T., ... & Gordon, T. R. (2017). The population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*, cause of *Fusarium* wilt of strawberry, in California. *Plant Disease*, 101(4), 550-556.

Hoch, H. C., Staples, R. C., Whitehead, B., Comeau, J., & Wolf, E. D. (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science*, 235(4796), 1659-1662.

Hyde K. D., Nilsson R. H., Alias S. A., Ariyawansa H. A., Blair J. E., Cai L., *et al.* (2014). One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I: *Botrytis*. *Fungal Divers.* 67 21–125.

Ismagulova, A., Spanbayev, A. D., Tulegenova, Z., & Eken, C. (2021). First Report of Preharvest Fruit Rot of Strawberry Caused by *Botrytis cinerea* in Kazakhstan. *Plant Disease*, 105(1), 213.

Jiménez, I. J. A. (2018). Encapsulación de *Beauveria bassiana* en biomateriales a base de polímeros (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN).

Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M., & Vinceković, M. (2019). Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(11), 2534-2548.

Kabbaj, F. Z., Lu, S., Faouzi, M. E. A., Meddah, B., Proksch, P., Cherrah, Y., ... & Debbab, A. (2015). Bioactive metabolites from *Chaetomium aureum*: Structure elucidation and inhibition of the Hsp90 machine chaperoning activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(1), 126-131.

Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Formulation technology of biocontrol agents: present status and future prospects. In *Bioformulations: For sustainable agriculture* (pp. 35-52). Springer, New Delhi.

Khalifa, S. A., Elshafiey, E. H., Shetaia, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Musharraf, S. G., ... & El-Seedi, H. R. (2021). Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. *Insects*, 12(8), 688.

Khalil, N. H., & Agah, R. J. (2017). Effect of chemical, organic and bio fertilization on growth and yield of strawberry plant. *Int. J. Adv. Chem. Eng. Biol. Sci*, 4(1), 5.

Khan, M. R., & Anwer, M. A. (2011). Fungal bioinoculants for plant disease management. In *Microbes and microbial technology* (pp. 447-488). Springer, New York, NY.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E. V. L., van der Does, H. C., ... & O'Connell, R. J. (2012). Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002643.

Koukounaras, A. (2021). *Advanced Greenhouse Horticulture: New Technologies and Cultivation Practices*.

Kuo, H. C., Hui, S., Choi, J., Asiegbu, F. O., Valkonen, J. P., & Lee, Y. H. (2014). Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. *Scientific reports*, 4(1), 1-6.

Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankulovska, M., & Oreshkovikj, K. B. (2018). Antagonistic activity of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma harzianum* against genetically diverse *Botrytis cinerea* isolates. *Chilean journal of agricultural research*, 78(3), 391-399.

Mixquititla-Casbis, G., Villegas-Torres, O. G., Andrade-Rodríguez, M., Sotelo-Nava, H., & Cardoso-Taketa, A. T. (2020). Crecimiento, rendimiento y calidad de fresa por

efecto del régimen nutricional. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(6), 1337-1348.

Leiva-Mora, M., Panimboza-Yanzapanta, J. G., Rivas-Figueroa, F., Rivera-Casignia, A., & Carpio, C. (2019). Agresividad diferencial entre aislados de *Botrytis cinerea* Pers. en *Fragaria vesca* L. cv. Albion. *Revista de Protección Vegetal*, 34(1).

Locatelli, G. O., dos Santos, G. F., Botelho, P. S., Finkler, C. L. L., & Bueno, L. A. (2018). Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological control*, 117, 21-29.

Lopes, A. R. D. O., Locatelli, G. O., Barbosa, R. D. M., Lobo Junior, M., Moura Mascarin, G., & Lamenha Luna Finkler, C. (2020). Preparation, characterisation and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 37(3), 270-282.

Macharia, J. M., Gikungu, M. W., Karanja, R., & Okoth, S. (2020). Managed bees as pollinators and vectors of bio control agent against grey mold disease in strawberry plantations. *African Journal of Agricultural Research*, 16(12), 1674-1680.

Mancera-López, M. E., Izquierdo-Estévez, W. F., Escalante-Sánchez, A., Ibarra, J. E., & Barrera-Cortés, J. (2019). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2), 107-130.

Mansouripour, S., & Holmes, G. J. (2020). First Report of *Botrytis cinerea* Causing Leaf Spot on Strawberry in California. *Plant Disease*, 104(6), 1866-1866.

Marin, M. V., & Peres, N. A. (2020). First Report of *Sclerotinia sclerotiorum* Causing Strawberry Fruit Rot in Florida. *Plant Disease*, 104(12), 3250-3250.

Maruyama, C. R., Bilesky-José, N., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 225.

Mazzoni, L., Perez-Lopez, P., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gasparini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., ... & Battino, M. (2016). The genetic aspects of berries: from field to health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 365-371.

McCluskey, K., & Baker, S. E. (2017). Diverse data supports the transition of filamentous fungal model organisms into the post-genomics era. *Mycology*, 8(2), 67-83.

Mena Chacón, L. M., Sarmiento Sarmiento, G. J., & Camargo Salcedo, P. (2017). Impacto del abonamiento integral en el rendimiento y calidad de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Selva bajo sistema de riego por goteo y cobertura plástica. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 357-366.

Mirete, S., Vázquez, C., Mulè, G., Jurado, M., & González-Jaén, M. T. (2004). Differentiation of *Fusarium verticillioides* from banana fruits by IGS and EF-1 α sequence analyses. In *Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi* (pp. 515-523). Springer, Dordrecht.

Mishra, J., & Arora, N. K. (2016). Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach. In *Bioformulations: For sustainable agriculture* (pp. 3-33). Springer, New Delhi.

Molnár, O., Bartók, T., & Szécsi, Á. (2015). Occurrence of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium musae* on banana fruits marketed in Hungary. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 62(2), 109-119.

Naranjo-Durán, A. M., Quintero-Quiroz, J., Rojas-Camargo, J., & Ciro-Gómez, G. L. (2021). Modified-release of encapsulated bioactive compounds from annatto seeds produced by optimized ionic gelation techniques. *Scientific Reports*, 11(1), 1-10.

Narayanasamy, P. (2013). *Biological management of diseases of crops* (pp. 295-429). Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Olas, B. (2018). Berry phenolic antioxidants—implications for human health? *Frontiers in pharmacology*, 9, 78.

Ortiz-Romero, N., Ochoa-Martínez, L. A., González-Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., & Gallegos Infante, J. A. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática. *Tecnológicas*, 24(52), e1962-e1962.

Palmer, M. G., Mansouripour, S. M., Blauer, K. A., & Holmes, G. J. (2019). First report of *Aspergillus tubingensis* causing strawberry fruit rot in California. *Plant Disease*, 103(11), 2948.

Pastrana, A. M., Ureba, M. B., & Capote, N. (2014). *Fusarium solani*: un nuevo patógeno en el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en España. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (257), 42-46.

Qi, F., Jing, T., & Zhan, Y. (2012). Characterization of endophytic fungi from *Hacer ginnala* Maxim. in an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. *Plos one*, 7(10), e46785.

Rajmohan, D., & Bellmer, D. (2019). Characterization of *Spirulina*-alginate beads formed using ionic gelation. *International journal of food science*, 2019.

Rebollar-Alviter, A., & Nita, M. (2011). Optimizing Fungicide Applications for Plant Disease Management: Case Studies on Strawberry and Grape. In *Fungicides-Beneficial and Harmful Aspects*. IntechOpen.

Reyna, E. N., Álvarez, G. M., Iliná, A., & Hernández, J. L. M. (2015). Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investigación y Ciencia*, 23(66), 64-70.

Rubinstein, J. (2015). *Fragaria xananassa*: past, present and future production of the modern strawberry.

Rubio, S. A., Alfonso, A. M., GRIJALBA, C., & Pérez, M. M. (2014). Determinación de los costos de producción de la fresa cultivada a campo abierto y bajo macrotúnel. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(1), 67-69.

Rubio-Tinajero, S., Osorio-Hernández, E., Estrada-Drouaillet, B., Silva-Espinosa, J. H. T., Rodríguez-Mejía, M., Lourdes, D., & Nava-Juárez, R. A. (2021). Biocontrol in vitro de *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi* con antagonistas. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 515-528.

Santos, A., Rocha Sobrinho, G. G., Mesquita, N. L. S., Novaes, Q. S., de Oliveira, R. J. V., Luz, E. D. M. N., & Bezerra, J. L. (2020). First Report of *Cladosporium tenuissimum* Causing Blossom Blight on Strawberry in the Brazil. *Plant Disease*, 104(9), 2519.

Santos, B. M., Obregón-Olivas, H. A., & Salamé-Donoso, T. P. (2010). Producción de hortalizas en ambientes protegidos: estructuras para la agricultura protegida. *EDIS*, 2010(6).

Santos, D., Maurício, A. C., Sencadas, V., Santos, J. D., Fernandes, M. H., & Gomes, P. S. (2018). Spray drying: an overview. Pignatello, R. (Comp.). *Biomaterials-Physics and Chemistry-New Edition*. InTech. UK, 9-35.

Schoebitz, M., & Belchí, M. D. L. (2016). Encapsulation techniques for plant growth-promoting rhizobacteria. In *Bioformulations: for sustainable agriculture* (pp. 251-265). Springer, New Delhi.

Selker, E. U. (2017) *Neurospora crassa*. In *Life Sciences*, Elsevier, ISBN 9780128096338, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.06790-X>Adhikari, T. B., Chacon, J. G., Fernandez, G. E., & Louws, F. J. (2019). First report of anthracnose causing both crown and fruit rot of strawberry by *Colletotrichum siamense* in North Carolina. *Plant Disease*, 103(7), 1775-1775.

Shalini, A., & Srivastava, R. (2008). Screening for antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against phytopathogenic fungi. *The International Journal of Microbiology*, 5(2), 1-6.

Sharma, A. (2019). Fungi as biological control agents. In *Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment* (pp. 395-411). Springer, Cham.

Shear, C. L., & Dodge, B. O. (1927). Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group (pp. 1019-1042). Washington, DC: US Government Printing Office.

Shi, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Xue, C., ... & Wang, F. (2021). First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Calyx and Receptacle Blight on Strawberry in China. *Plant Disease*, (ja).

Soares, V. F., Velho, A. C., Carachenski, A., Astolfi, P., & Stadnik, M. J. (2021). First report of *Colletotrichum karstii* causing Anthracnose on strawberry in Brazil. *Plant disease*, (ja).

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., ... & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: the “secrets” of a multitaled biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762.

Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Van Kan, J. A., Shaw, M. W., & Grant-Downton, R. T. (2014). *Botrytis* species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue?. *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 957-961.

Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380-389.

Villarino, M., De la Lastra, E., Basallote-Ureba, M. J., Capote, N., Larena, I., Melgarejo, P., & De Cal, A. (2019). Characterization of *Fusarium solani* populations associated with Spanish strawberry crops. *Plant disease*, 103(8), 1974-1982.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.

Wang, X. W., Houbaken, J., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K. F., ... & Samson, R. A. (2016). Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and *chaetomium*-like fungi from indoor environments. *Studies in mycology*, 84, 145-224.

Warner, R., Wu, B. S., MacPherson, S., & Lefsrud, M. (2021). A review of strawberry photobiology and fruit flavonoids in controlled environments. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Yadav, S. K., Khokhar, U. U., Sharma, S. D., & Kumar, P. (2016). Response of strawberry to organic versus inorganic fertilizers. *Journal of Plant Nutrition*, 39(2), 194-203.

Yunta, E. R. (2013). Ethical topics in international research with transgenic food. *Temas éticos en investigación internacional con alimentos transgénicos*.

Zhang, J. C., Chen, G. Y., Li, X. Z., Hu, M., Wang, B. Y., Ruan, B. H., ... & Yang, Y. B. (2017). Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Natural product research*, 31(23), 2745-2752.

Zhang, J., Kou, J., Ozbudak, E., Zhong, T., Pan, T., Bai, J., ... & Ritenour, M. A. (2020). First Report of *Gilbertella persicaria* Causing Postharvest Soft Rot of Strawberry Fruit in Florida. *Plant Disease*, 104(10), 2736.

Zhong, S., Zhang, J., & Zhang, G. Z. (2019). *Botrytis polyphyllae*: A new botrytis species causing gray mold on *Paris polyphylla*. *Plant disease*, 103(7), 1721-1727.

Zhou, Y. J., Zhang, J., Wang, X. D., Yang, L., Jiang, D. H., Li, G. Q., ... & Zhuang, W. Y. (2014). Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. *Mycologia*, 106(1), 43-56.

Hussain, A., Iqbal, K., Aziem, S., Mahato, P., & Negi, A. K. (2014). A review on the science of growing crops without soil (soilless culture)-a novel alternative for growing crops. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(11), 833.