



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## Instituto de Ciencias

Identificación y caracterización morfológica de *Neopestalotiopsis* sp. y *Pestalotiopsis* sp. asociado a la podredumbre de raíz y corona en el cultivo de fresa en Guanajuato: Efecto de los endófitos en el control biológico

Tesis para obtener el Título de Maestra en Ciencias Microbiológicas

Presenta:

**IBT. Karla Azucena Salazar Morin**

Asesores:

Director: Dr. Antonino Baez Rogelio

Co-director: Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes

Puebla, Puebla, enero 2024



**BUAP**

Puebla, Pue. a 2 de diciembre 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **Karla Azucena Salazar Morin**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Identificación y caracterización morfológica de *Neopestalotiopsis* spp. *Pestalotiopsis* spp. asociados a la podredumbre de raíz y corona en el cultivo de fresa en Guanajuato: Efecto de los endófitos en el control biológico"**


A nuestro juicio, la alumna **Karla Azucena Salazar Morin** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

  
D.C. Vianey Marin Cevallos

  
D.C. Omar Romero Arenas

  
D.C. José Antonio Munive Hernández

  
D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

# Dedicatoria

A Dios

Por darme la sabiduría para llevar a cabo los proyectos que me han llevado a donde estoy, por motivarme y no dejarme sola.

A mis abuelos

Por creer en mí, por mostrarme mis alas y darme mucho amor. Un abrazo enorme hasta el cielo, sé que desde allá están felices por verme cumplir mis sueños.

A mis padres

Por ayudarme a emprender mi vuelo, por no cortarme las alas nunca y apoyarme en cada paso que doy.

A mis hermanas

Por ser mi apoyo incondicional, por ser pacientes y darme mucho amor, cariño y comprensión.

A mis sobrinos

Por mostrarme lo que es el amor incondicional. Hacen mi vida más hermosa.

A mí

Por la valentía para seguir a pesar de los tropiezos, por creer en mí y alentarme a ser cada día mejor.

# Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca 821983 otorgada para el financiamiento de mis estudios de maestría.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) y al Instituto de Ciencias por elegirme y darme la oportunidad de continuar con mi formación profesional. Y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por su apoyo para la asistencia en el XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

Al Dr. Antonino Baez por tener la dirección de este proyecto, por su confianza, por permitirme crear mis ideas, por guiarme, por su dedicación y paciencia en la elaboración del proyecto de tesis.

Al Dr. Carlos Contreras por su apoyo como coasesor en la creación del proyecto, por su disponibilidad, por su compromiso y guía, sobre todo por su ayuda en la parte molecular y por ser la conexión con la empresa donde ahora laboro, mil gracias.

A mi comité tutorial, Dr. José Munive por su apoyo y guía en el proyecto, al Dr. Omar Paredes también por su guía y su ayuda en la parte bioinformática. Y en especial a la Dra. Vianey Marín por su apoyo desde antes de entrar a la maestría, por su guía y ayuda en varias cuestiones del proyecto, muchas gracias.

A todos mis maestros formadores que me ayudaron a contemplar un mundo más grande del que ya conocía, por motivarme a seguir aprendiendo cada día más, por sus charlas motivadoras, por sus consejos, por compartir su conocimiento y experiencia, gracias.

A mis compañeros y amigos de clase, Griss, Chio, Vite, Armando, Shei, Fer, Rigel, Marina, Fany, Emiliano, que, aunque nos veíamos poco debido a que me encontraba en otro edificio, cada momento que compartimos fue muy bueno, por ser buenas personas y apoyarme a no desistir. Un placer haber coincidido con ustedes. Griss, mil gracias por apoyarme y ayudarme con mi proyecto, sobre todo por ser una gran amiga, por escucharme y no dejarme sola, te quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio; Vero, Karen, Meli, Frida, Karen, Oscar, Alexis, Isma, Kevin, por hacer más amena la estancia en él.

A Alexis y Sandybell por no dejarme sola, por escucharme y por cada momento compartido, por su conocimiento y nuestras pláticas profundas, los llevo en el alma y agradezco infinitamente a la vida por haberme permitido conocerlos. A Luz y Alice, por apoyarme e integrarme en su colectivo, es un dicha ser parte de él.

A mis papás por apoyarme en cumplir mis sueños, por sus consejos para poder seguir. Mil gracias, los quiero demasiado.

A mis incondicionales, Irany porque a pesar de la distancia nuestra amistad sigue intacta, gracias por estar siempre. A mis hermanas por su paciencia, por su apoyo, por escucharme y animarme a seguir. A mis sobrinos por su amor, porque cada momento a su lado me hace muy feliz; porque por ustedes quiero seguir volando y poder darles mucho. A Luis Mendoza, por ser un gran apoyo en esta etapa, por no dejarme sola y sobre todo por ser paciencia, por esperarme, escucharme y apoyarme en mis sueños; una gran dicha que seas parte de mi vida, te adoro.

A todos y cada uno que los que de una u otra forma formaron parte de esta etapa, gracias.

# Contenido

Dedicatoria .....	1
Agradecimientos.....	2
Índice de figuras .....	5
Resumen .....	7
Introducción .....	8
Marco teórico .....	10
1. Generalidades de la fresa.....	10
1.1 Características de la planta .....	10
1.2 Importancia comercial en México .....	12
1.3 Enfermedades importantes causadas por microorganismos en el cultivo de fresa.....	13
1.3.1 Enfermedades causadas por bacterias .....	13
1.3.2 Enfermedades causadas por virus .....	13
1.3.3 Enfermedades causadas por hongos .....	14
1.3.3.1 Oidio o mildium polvoroso causado por <i>Podosphaera aphanis</i> .....	14
1.3.3.2 Marchitamiento por <i>Fusarium</i> .....	14
1.3.3.3 Podredumbre de la raíz y corona por <i>Phytophthora</i> spp. ....	15
1.3.3.4 Antracnosis ocasionada por <i>Colletrotrichum</i> spp. ....	15
1.3.3.5 Moho o podredumbre gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> .....	16
1.3.3.6 Marchitez causada por <i>Verticillium dahliae</i> .....	16
2. Generalidades del género <i>Neopestalotiopsis</i> .....	17
2.1 Historia .....	17
2.2 Género <i>Neopestalotiopsis</i> .....	19
2.3 Ciclo de vida de <i>Pestalotiopsis</i> .....	20
3. Organismos endófitos como agentes biocontroladores .....	23
Justificación.....	26
Hipótesis.....	26
Objetivos .....	27
Materiales y métodos .....	28
1. Aislamiento del supuesto hongo fitopatógeno y de los organismos endófitos presentes en la fresa ..	28
2. Aislamiento del hongo fitopatógeno .....	28

3. Aislamiento de los organismos endófitos .....	28
4. Identificación parcial de los organismos aislados.....	29
5. Postulados de Koch .....	30
6. Caracterización molecular del hongo fitopatógeno y de los organismos endófitos con actividad antagonista.....	30
7. Actividad antagonica <i>in vitro</i> .....	32
8. Actividad de biocontrol <i>in planta</i> .....	33
9. Actividad de promoción de crecimiento .....	33
Resultados y discusión .....	35
Conclusiones .....	55
Bibliografía.....	56
Anexos.....	63

# Índice de figuras

Figura 1. Anatomía de la planta de fresa (Bolda, 2015). Tomada de (Morales, 2019) .....	10
Figura 2. Fenología del cultivo de fresa. Tomado de (Matos, 2023). DDS son los días después de siembra y DDP se refiere a los días después de plantación .....	11
Figura 3. Ciclo de enfermedad del género <i>Pestalotiopsis</i> . (Recuperado y traducido de Machchikumbura et al. 2011) .....	21
Figura 4. Metodología empleada para el aislamiento de organismos endófitos de diferentes tejidos de la fresa.....	29
Figura 5. Representación del método de cultivo dual para el estudio de la actividad antagonista de los aislados endófitos.....	32
Figura 6. Plantas de fresa con síntomas de “Pestalotia”. a) Hojas con coloración rojo-morado de tono cobrizo; b) Síntomas que avanzan de las orillas de las hojas hacia el centro, también la presencia de manchas tipo tizón; c) Marchitez general de la planta; d) Pudrición de la corona, decoloración marrón-rojizo.....	36
Figura 7. Morfología de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. AFHP1 aislado de la fresa. a) Micelio blanco algodonoso y de aspecto lanudo, crecido en medio PDA y con 7 días de edad; b) Conidios de tipo fusiforme, con 5 células (las tres del medio de tonalidad versicolor, la célula basal y apical son hialinas y con un apéndice y 3 o 4 cada una de ellas, respectivamente); c) Conidioma, cuerpos fructíferos de color negro y concéntricos; d) Reverso de la placa, se observa una tonalidad beige o amarillo pálido.....	37
Figura 8. Árbol filogenético generado mediante el método de Inferencia Bayesiana con 1 millón de generaciones, la desviación estándar final fue 0,002516. El patrón de sustitución de nucleótidos para ITS fue GTR + G, para TEF1 fue GTR + I + G y para B-Tub fue GTR + I + G.....	40
Figura 9. Segundo árbol filogenético generado mediante el método de Inferencia Bayesiana con 1 millón de generaciones, la desviación estándar final fue 0,002516. El patrón de sustitución de nucleótidos para ITS fue GTR + G, para TEF1 fue GTR + I + G y para B-Tub fue GTR + I + G.....	41
Figura 10. Infección de las plantas de fresa con el hongo <i>Neopestalotiopsis</i> sp. AFHP1 para la evaluación de los postulados de Koch. En la parte superior están las plantas inoculadas a la raíz; a) Control, c) Planta pequeña, e) Planta grande. En la parte inferior las plantas inoculadas al follaje; b) Control, d) Planta pequeña, f) Planta grande.....	42
Figura 11. Pudrición en la corona. a) Coronas del tratamiento control, b) coronas de plantas que fueron inoculadas con <i>Neopestalotiopsis</i> sp. AFHP1 en la base de la corona.....	43
Figura 12. Reaislamiento de <i>Neopestalotiopsis</i> sp AFHP1. a) Coloración morada-rojiza, b y c) coronas de plantas que fueron tratadas con <i>Neopestalotiopsis</i> sp AFHP1 (a) tratamiento con agua y c) tratamiento con <i>Neopestalotiopsis</i> sp AFHP1, d) Hongo reaislado con características macroscópicas antes vistas y e) Conidios con características microscópicas antes vistas.....	44
Figura 13. Árbol filogenético para el hongo reaislado basado en secuencias ITS de especies de <i>Neopestalotiopsis</i> y <i>Pestalotiopsis</i> . Modelo de mínima evolución elaborado en MEGA 11.....	45
Figura 14. Porcentaje de organismos endófitos en los diferentes tejidos de la fresa, de un total de 36 aislados (33 bacterias y 3 hongos).....	46

Figura 15. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. AHFP1 por bacterias aisladas de la fresa. Las barras de color verde muestran los organismos aislados del tallo, las de color rosa del fruto, las café son de la raíz y el verde bandera de la hoja.....	47
Figura 16. Características morfológicas y microscópicas del aislado AFBCC, similares a las del género <i>Bacillus</i> .....	47
Figura 17. Árbol filogenético basado en secuencias 16S de especies de <i>Bacillus</i> spp. Modelo de mínima evolución elaborado en MEGA 11 con valores de Bootstrap de 2000 repeticiones.....	48
Figura 18. Técnica de cultivo dual para evaluar la capacidad antagonista del endófito aislado de la fruta de la fresa AFBCC contra <i>Neopestalotiopsis</i> sp AFHP1 en medio PDA. Se realizaron 3 réplicas.....	49
Figura 19. Evaluación “in planta” de la actividad de biocontrol del aislado AFBCC contra <i>Neopestalotiopsis</i> sp. AFHP1 en plantas de fresa. Rectángulo de color verde indica el tratamiento de AFBCC inoculado a la raíz (BR) y el hongo AFHP1 al follaje (NF) y raíz (NR), el rectángulo color azul muestra el tratamiento de AFHP1 a la raíz (NR) y al follaje (NF), el rectángulo morado revela el tratamiento de AFBCC inoculado a la raíz (BR), el amarillo muestra a AFBCC inoculado al follaje (BF) y el hongo AFHP1 inoculado a la raíz (NR) y al follaje (NF) y el rectángulo rojo indica las plantas control, tratadas solo con agua.....	51
Figura 20. Efecto de biocontrol ejercido por el <i>Bacillus</i> spp. AFBCC contra <i>Neopestalotiopsis</i> sp. AFHP1 a nivel de corona.....	51
Figura 21. Efecto promotor del crecimiento por el <i>Bacillus</i> sp. AFBCC en la altura y el peso fresco de plantas de fresa de 6 semanas de edad tratadas con el aislado. Las medias se compararon mediante una prueba t-student, con un valor de significancia de $\alpha=0.05$ .....	52
Figura 22. Solubilización de fosfato en medios Pikovskaya (a) y NBRIP (b).....	54
Figura 23. Otras cepas con la misma morfología que <i>Neopestalotiopsis</i> sp. aisladas de diferentes tejidos.....	63
Figura 24. Hongo <i>Fusarium</i> sp. aislado de la raíz de la fresa. a) Características coloniales, b) Microconidios del género, c) Macroconidios y d) Clamidiosporas. Identificado mediante las tablas de Barnett & Hunter (1998).....	63
Figura 25. Hongo <i>Alternaria</i> sp. aislado de las hojas de la fresa. a) Características coloniales, b) Conidióforo simple. C y d) Conidios característicos del género.....	63
Figura 26. Hongo <i>Cladosporium</i> sp. aislado de las hojas de la fresa, a) Características coloniales, b) Hifas septadas, c) Conidióforos compuestos y d) Conidios característicos del género.....	64
Figura 27. Hongo <i>Trichothecium</i> sp. aislado de la raíz de la fresa, a) Características coloniales, b) hifas septadas, c) conidióforos simple y d) Conidios característicos del género.....	64
Figura 28. Diferentes interacciones de antagonismos en cultivo dual. En la parte superior se observa una bacteria no antagonista, en la parte de en medio una ligeramente antagonista y debajo una buena bacteria antagonista.....	65

## RESUMEN

Durante 2021-2022, la producción de fresa se vio seriamente afectada en el estado de Guanajuato, debido a una enfermedad emergente conocida coloquialmente como “Pestalotia”. Los síntomas que se observaban en los cultivos eran manchas foliares tipo tizón, coloración morada cobriza, marchitez generalizada y además zonas necróticas en corona y raíz que provocaron pérdidas de hasta un 70% de las parcelas sembradas. En este trabajo se aisló a partir de plantas de fresa con sintomatología de “Pestalotia”, un hongo con las características macro y microscópicas parecidas al género *Neopestalotiopsis*. Con dicho hongo (*Neopestalotiopsis* sp. AFHP1) se realizaron pruebas de patogenicidad aplicando los postulados de Koch y observando que cuando el hongo AFHP1 era inoculado en la corona de las plantas de fresa causaba síntomas típicos de la enfermedad “Pestalotia”. A partir de las plantas infectadas se pudo recuperar un hongo morfológicamente similar al aislado AFHP1. La identificación del hongo AFHP1 se realizó mediante un análisis filogenético con inferencia bayesiana de tres loci de genes: ITS, TUB y TEF; confirmando que el hongo AFHP1 se agrupaba en el mismo clado que *Neopestalotiopsis rosae*, *N. maddoxii*, *N. javensis* y *N. mesopotámica*, pudiendo ser cualquiera de estas especies. Además, se evaluó la actividad antagonista de 36 organismos endófitos aislados de diferentes tejidos de la fresa contra *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1. De los aislados se seleccionó una cepa de *Bacillus* sp. AFBCC, la cual presentó un porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *in vitro* por encima del 90%. Después se realizó un ensayo de biocontrol *in planta* usando el *Bacillus* sp. AFBCC. Los resultados mostraron que la inoculación de *Bacillus* sp. AFBCC en la corona de las plantas disminuyó la pudrición de la misma, concluyendo que este organismo endófito pudiera emplearse como parte del manejo integral de esta enfermedad.

**Palabras clave:** *Neopestalotiopsis* spp., biocontrol, antagonismo, endófito, *Bacillus* spp.

# Introducción

La fresa (*Fragaria × ananassa*) es la onceava fruta más producida en México, tan solo en el 2021 se logró una producción de 93 mil toneladas (SIAP; 2022); en el grupo de las “Berry” es la principal, y adquiere una gran importancia comercial debido a que se exporta a Estados Unidos en gran volumen.

Además de ser un fruto de importancia económica es de gran valor nutricional ya que contiene vitaminas, compuestos bioactivos con capacidad antioxidante y antiinflamatoria, así como un gran número de compuestos minerales necesarios en la dieta. Se ha estudiado que el consumo de estas frutas puede ayudar en ciertas enfermedades cardiovasculares, en procesos de inflamación, diabetes y en cánceres, entre otras (Miller, Feucht y Schmid, 2019).

Desde hace al menos 3 años, el cultivo de fresa en el estado de Guanajuato se ha visto afectado por la aparición de un hongo asociado a la podredumbre de la raíz y la corona, así como la aparición de manchas foliares que llevan al marchitamiento de la planta y la muerte de esta. También se ha observado la aparición de acérvulos en las hojas de las plantas infectadas.

Las pérdidas económicas por esta enfermedad son altas, en el año 2022 el 70% de las hectáreas sembradas en el estado de Guanajuato se vieron afectadas, siendo Pénjamo el principal municipio afectado, seguido de Guanajuato Capital y en tercer lugar Irapuato (Periódico AM, 2022).

Estudios en el estado de Michoacán han identificado y caracterizado a este agente causal como *Pestalotiopsis*, razón por la cual la enfermedad en Guanajuato se ha llamado “Pestalotia”. Sin embargo, también se ha relacionado taxonómicamente con *Neopestalotiopsis* (Rebollar-Alviter *et al.*, 2020). En este trabajo se muestra como por este hongo se perdió el 50% de las plántulas trasplantadas en Zamora Michoacán; convirtiéndose en un caso alarmante para los productores.

El primer avistamiento de la enfermedad fue reportado en Atlixco Puebla, las plantas presentaban síntomas parecidos a los que se han observado recientemente; manchas foliares, pudrición de la raíz y corona y marchitamiento general de la planta. Estos mismos síntomas se han identificado también en otros países como Estados Unidos (Florida), Uruguay, Argentina, Italia, España, Ecuador, entre otros (Chamarro *et al.*, 2015; Najmeh y Mohammad, 2016; Machin *et al.*, 2019; Ramirez-Villacis, 2021).

Aún no se cuenta con un plan de manejo que solucione la problemática que genera esta enfermedad. Sin embargo, el gobierno municipal y el estatal, junto con el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG) están implementando medidas para la mitigación de la enfermedad; el manejo integral con el uso de químicos y biológicos, podría ser una buena alternativa para el control de este hongo fitopatógeno.

El uso de organismos antagónicos como los pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Bacillus*, y *Pseudomonas* podría ser efectivo en el tratamiento de la enfermedad “Pestalotia”. Diversos estudios han demostrado la capacidad antagónica de estos géneros contra varios hongos fitopatógenos (Ramirez, 2010; Morales *et al.*, 2020; Doin de Moura *et al.*, 2021; Widyaningsih y Triasih, 2021).

En el presente trabajo se identificó al microorganismo causante de la pudrición de raíz y corona del cultivo de fresa en el estado de Guanajuato. Además, se estudió el efecto de los organismos endófitos (hongos y bacterias) de la misma fresa con actividad antagónica contra el agente causal de la enfermedad *in vitro* e *in planta*.

# Marco teórico

## 1. Generalidades de la fresa

### 1.1 Características de la planta

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es una planta perenne que pertenece a la familia Rosaceae, es de tipo herbáceo con un sistema radicular fasciculado compuesto de raíces y raicillas, de no más de 50 cm de altura, con muchas hojas trifoliadas que comienzan en la base de la corona que se encuentra a nivel del suelo; siendo la base de crecimiento de la planta. Sus flores son blancas, organizadas en cimas y con un cáliz de cinco piezas hendidas, con cinco pétalos y con estambres y pistilos (SAGARPA, 2017). El fruto, también llamado receptáculo, al llegar a su madurez puede alcanzar un diámetro de hasta cinco cm con forma cónica alargada, globosa, entre otras. Su color popularmente es rojo o rojo carmín. Un fruto mediano puede tener entre 150 a 200 aquenios, conocidos coloquialmente como “semillas” y uno maduro hasta 400 (Celia, 2004). En la figura 1 se observan las características anatómicas.

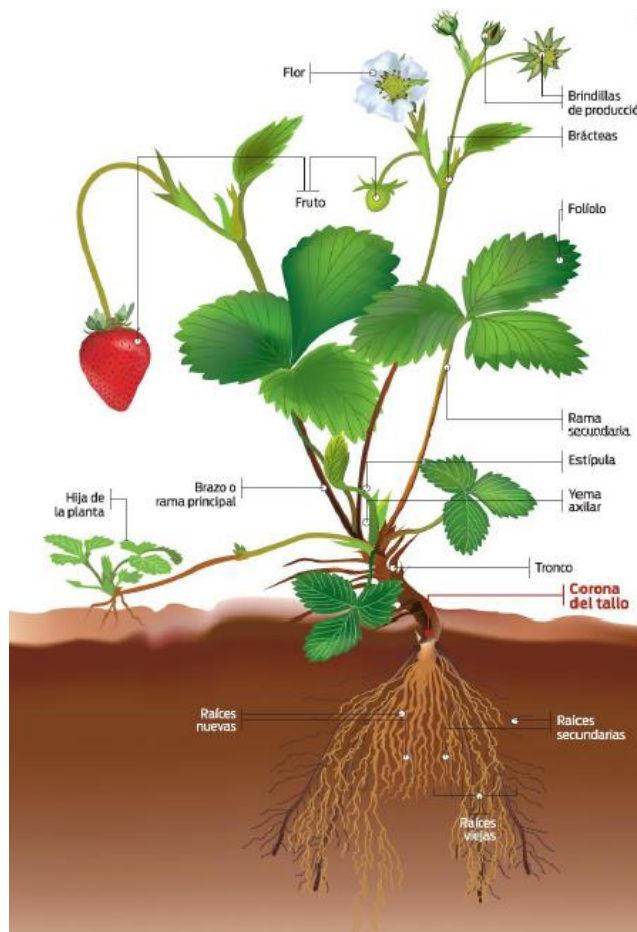


Figura 1. Anatomía de la planta de fresa (Bolda, 2015). Tomada de (Morales, 2019).

Los requerimientos edafoclimáticos para su cultivo varían según la variedad y lugar donde se cultiva. La temperatura oscila entre los 10-25°C, siendo 12-18°C lo óptimo. La humedad relativa de entre 65-70%, el agua debe tener una conductividad eléctrica mayor a 0.8 dS/m y menos a 1.5 dS/m, evitando con ello problemas por sales, ya que no hay tolerancia (Vallejo, 2021). El suelo tiene que ser de tipo arenoso o franco-arenoso y debe tener un contenido rico de materia orgánica, buen drenaje y aireación, con pH moderadamente ácido de entre 5.5-6.5 (Benacchio, 1982; Citado por Martínez, 2020).

La fenología del cultivo se desarrolla en etapa vegetativa y productiva. En la primera etapa salen los brotes y las yemas principales comienzan a crecer. Posteriormente se da el desarrollo de las hojas; de las primeras hojas emergentes y después de las primeras hojas desplegadas hasta nueve o más. Seguido del desarrollo de las partes vegetativas coséchales, por la formación de los brotes hijos, conocidos como estolones que darán origen a nuevas plantas. En la etapa reproductiva aparece el órgano floral, para después darse la floración (primeras flores abiertas, floración y caída de pétalos). Finalmente, la etapa productiva se da mediante la formación del fruto, su maduración y posteriormente la senescencia y comienzo del reposo vegetativo (figura 2), (ITSC, 2018).

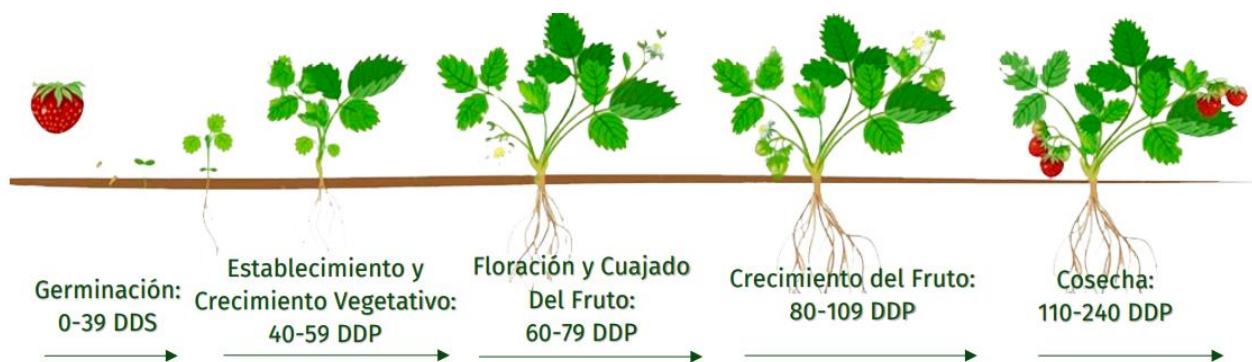


Figura 2. Fenología del cultivo de fresa. Tomado de (Matos, 2023). DDS son los días después de siembra y DDP se refiere a los días después de plantación.

Los brotes o estolones son el método de propagación de plantas de fresa más utilizado, siendo una técnica de bajo costo de producción, otorgando homogeneidad en las plantas hijas y reduciendo el tiempo de producción. Estos deben provenir de una planta madre de calidad genética y fisiológica, con las características organolépticas deseadas según la variedad (Juárez-Rosete et al. 2020). Es esencial conocer el origen de la planta madre, su certificación, calidad fitosanitaria y resistencia o tolerancia a enfermedades y plagas. Al ser la planta madre el material vegetal para la propagación, se debe tener una evaluación completa y manejo adecuado durante su estancia en vivero, con el fin

de evitar la aparición de enfermedades y permitiendo un desarrollo homogéneo y de calidad a partir del material de origen (Lira & Ruíz, 2023).

## 1.2 Importancia comercial en México

El fruto de la fresa se consume primordialmente en fresco y es apreciado por su aroma, sabor y propiedades nutricionales; ya que es una fuente de vitamina C, fenoles y antocianinas y otros compuestos bioactivos. Estos compuestos han sido estudiados por sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras (Wang *et al.*, 2016; Miller, 2019; Tarazona, 2020).

También es ampliamente usada en la industria alimenticia, principalmente en la elaboración de mermeladas, jaleas, saborizantes y además empleada en la repostería como ingrediente de postres. Por todo lo anterior la producción del fruto permite la importación y exportación, siendo valioso para la economía mundial.

En julio de 2024, el secretario de Agricultura y Desarrollo Rural en México, Víctor Villalobos Arámbula; señaló en la conferencia magistral “El impacto de las berries en el sector agroalimentario de México”, en el marco de la edición 14 del Congreso Internacional Anaberries, que la producción de berries son “orgullo de México” al situar al país entre el primer y segundo lugar de la clasificación mundial de exportación (siendo Estados Unidos y Canadá los principales adquisidores), además mencionó que la producción de berries en 2024 iba a la alza porque la producción en 2023, había alcanzado las 641 mil 552 toneladas y que teniendo un corte preliminar en mayo de 2024 se tenía una producción de 397 mil 234 toneladas y aún faltaban meses para la cosecha completa (SADER, 2024).

“En 2024, la producción nacional de fresa alcanzó las 641 mil 552 toneladas, con un corte realizado al 31 de mayo, alcanzando 397 mil 234 toneladas, y aún faltaban meses para la cosecha completa (SADER, 2024).”

En México, Guanajuato fue el primer Estado donde se comenzó el cultivo de la fresa con plantíos de variedades originarias de Lyon, Francia (SAGARPA, 2017). Durante el año 2023, según la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), 22 de los 46 municipios del Estado de Guanajuato aportaron con la producción de fresa; logrando así colocarse en el segundo lugar a nivel nacional con una producción de 100 mil 971 toneladas al año, estando por debajo del Estado de Michoacán que genero 326 mil toneladas y Baja California en tercer lugar produciendo 91 mil toneladas. Los municipios en Guanajuato con mayor aportación fueron: Irapuato, Tarandacuao,

Abasolo, Romita y Manuel Doblado, los cuales, aun teniendo un panorama complicado a causa de las enfermedades y la intensa sequía. En 2019, el municipio de Irapuato se vio fuertemente afectado por la enfermedad “pestaliota”, teniendo afectaciones de hasta el 90% de pérdidas en los cultivos; pasando de tener el primer lugar en producción a estar en el séptimo lugar.

Si bien, la calidad y el rendimiento del cultivo son los objetivos primordiales de la producción fresa. Estos objetivos dependen en gran instancia del uso de agroquímicos para la desinfección del suelo y el tratado de las enfermedades; además de los insumos químicos para el desarrollo de la planta (Pastrana *et al.*, 2016, citado por Saldaña, 2021). No obstante, los objetivos anteriores se ven mermados principalmente por el ataque de organismos patógenos, causando pérdidas económicas en los cultivos (Gastón *et al.*, 2019; citado por Saldaña, 2021).

### 1.3 Enfermedades importantes causadas por microorganismos en el cultivo de fresa

#### 1.3.1 Enfermedades por bacterias

La mancha angular en la hoja es causada por *Xanthomonas fragariae*, es una enfermedad importante en regiones de producción de fresa, principalmente en producción de invernadero. Los síntomas de esta enfermedad aparecen principalmente como lesiones diminutas, translúcidas y acuosas en la superficie interior de la hoja; las cuales agrandan hasta la formación de manchas angulares que son delimitadas por pequeñas nervuras (Mass, 1998; Wang, 2017). Conforme va avanzando la enfermedad, las manchas se observan de color rojo-necrótico en el haz y que van creciendo en forma de V, enmarcadas por un halo clorótico (Martínez, 2020).

#### 1.3.2 Enfermedades por virus

Las enfermedades virales de la fresa van en aumento debido a que el cultivo se ha plantado en nuevas regiones, exponiéndose a nuevos virus. Los daños que causan estos organismos son: decoloración de hojas, clorosis, enrojecimiento, atrofia del sistema vascular y hojas, propiciando el deterioro de la planta. La mayoría de los virus son transmitidos por vectores siendo los transmitidos por áfidos los más importantes y estudiados tales como: Virus rugoso (SCV), Virus del borde amarillo suave (SMYEV), Virus del moteado (SMoV), Virus de la curvatura de las venas (SVBV), Virus del borde amarillo pseudo suave (SPMYEV), Virus de la mancha clorótica (SCFV), Virus latente C (SLCV). Los virus SCV, SMYEV, SMoV y SVBV son los que tiene mayor importancia comercial debido al daño que causan. Unos son transmitidos por la mosca blanca: 4 por crinivirus y un geminivirus y otros por nemátodos (Martin & Tzanetakis, 2012).

En un estudio elaborado en 2014 por Contreras-Paredes y cols. en los municipios de Irapuato y Abasolo en el Estado de Guanajuato, detectaron 7 virus en 57 muestras de fresa con sintomatología asociada a virus y además por la presencia de vectores. Los virus encontrados fueron: SCV, SMOV, el virus críptico de *Fragaria chiloensis* (FCICV), el latente de *Fragaria chiloensis* (FCICLV), el asociado a la palidosis de la fresa (SPaV), el choque necrótico de la fresa (SNSV) y el amarillamiento marginal tenue de la fresa (SMYEV); presentes en infecciones sencillas y complejas, conformando así el complejo viral local de la fresa (LSCV). Pudiendo ser esto una de las causas del decaimiento de la producción de la fresa a nivel nacional en el Estado de Guanajuato.

### 1.3.3 Enfermedades por hongos

Existen varios hongos que pueden causar enfermedades en la fresa afectando diversas partes de la planta. Algunos afectan principalmente el follaje, otros a la raíz, otros raíz y corona y otros el fruto. Y la mayoría depende del modo de dispersión que tenga el hongo. A continuación, se describen los principales hongos que causan daños en el cultivo de fresa.

#### 1.3.3.1 Oidio o mildium polvoroso causado por *Podosphaera aphanis*

Importante enfermedad foliar conocida como cenicilla y que daña principalmente a las hojas, pero que también es capaz de presentarse en las flores, los pecíolos y frutas. Los síntomas son fáciles de distinguirse, ya que, se observan costras de micelio blanco envés de las hojas y posteriormente las orillas de estas se van enrollando hacia arriba, apreciándose mejor el micelio. El progreso de la enfermedad se percata por que se ven manchas purpuras-rojizas en la superficie superior de las hojas. Ocasionalmente se ve la aparición de las ascosporas. La infección al dañar las hojas reduce la fotosíntesis reduciendo los rendimientos de los cultivos, causando necrosis y la defoliación (Mass, 1998; Wang *et al.*, 2019; Morales, 2020).

#### 1.3.3.2 Marchitamiento por *Fusarium*

Marchitez por *Fusarium* es una enfermedad importante en el mundo entero, esta es causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. fragarie., este organismo reside en el suelo y las raíces infectadas y puede estar presente como hongo saprófito (Burkhardt *et al.*, 2019). Posee la capacidad de desplazarse a través del xilema estableciéndose la infección de forma sistémica, impidiendo el paso de agua y nutrientes, y transfiriéndose así a las plantas hijas de forma asintomática. Los síntomas incluyen el retraso del crecimiento, necrosis y secadera de hojas y pecíolos, descoloramiento de la corona y colapso o muerte de la planta (Pastrana *et al.*, 2019). En campos no desinfectados o sin el tratamiento adecuado, los síntomas aparecen poco antes de los 30 días después del trasplante, las

plantas dejan de crecer diferenciándose claramente de plantas sanas. A menudo los síntomas aparecen cuando las plantas ya están establecidas, en etapa de la floración o producción del fruto; las hojas viejas se marchitan cambiando de color a verde a grisáceo y se secan (Koike y Gordon, 2015).

#### 1.3.3.3 Podredumbre de la raíz y corona por *Phytophthora* spp.

El género *Phytophthora* contiene más de 100 especies que son patógenos de plantas. En el caso del cultivo de fresa las especies *P. fragariae* y *P. cactorum* han sido las destructivas en dicho cultivo. Es un oomiceto que origina la pérdida del rendimiento de hasta en un 40% (Sanchez, *et al.*, 2019). Este género causa principalmente síntomas de pudrición en corona y raíz, además de daño foliar y de los frutos. Cuando afecta la corona se observa una decoloración café visible al cortar la corona, el síntoma se ve en la base o en el medio de la corona. Una infección severa en la corona causa una disfunción del sistema vascular y muerte progresiva de las raíces (Meszka y Michalecka, 2016). *P. cactorum* puede causar pudrición de la raíz y corona, además de daño foliar y de los frutos. Cuando afecta la corona se observa una decoloración café visible al cortar la corona, el síntoma se ve en la base o en el medio de la corona. *Phytophthora* sp. también afecta al fruto, generando un sabor desagradable. La fruta madura presenta un ligero cambio en su coloración, pero parece fruta sana. Sin embargo, un tejido sano de una fruta ligeramente podrida tiene un sabor muy desagradable. Tanto los frutos verdes como los maduros acaban secándose y formando momias duras y arrugadas. El olor y el sabor desagradables de los frutos afectados por la podredumbre son síntomas diagnósticos de la enfermedad (Mass, 1998).

El hongo es capaz de formar estructuras resistentes conocidas como oosporas y zoosporas y que son fuente importante para la aparición de la enfermedad en las zonas de producción (Armitage *et al.*, 2018). La propagación del hongo se da primordialmente por el riego, al permitir la diseminación de las esporas a través del agua (Adams *et al.*, 2020).

#### 1.3.3.4 Antracnosis ocasionada por *Colletrotrichum* spp.

Existen tres especies de *Colletrotrichum* que afectan los cultivos de fresa, *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* (Xiao *et al.*, 2004). Los síntomas de la infección por el hongo incluyen la pudrición de la corona, de la fruta, necrosis de la raíz, mancha irregular marrón de la hoja y manchado de peciolos y estolones. Cuando infecta la corona se da como resultado la marchitez y muerte de las plantas (Horn y Carver, 1962; Mass, 1998). Las plantas madre afectadas por la enfermedad pueden tener un colapso general debido a la pudrición de la corona. Bajo condiciones

de humedad alta, se muestra la aparición de anillos concéntricos de acérvulos con masas conidiales pueden observarse en tejidos necróticos (Che *et al.*, 2020). La dispersión por salpicadura es el principal medio de diseminación del hongo; la temperatura entre 15-30°C favorece la aparición de la enfermedad (Freeman, 2008).

#### 1.3.3.5 Moho o podredumbre gris causada por *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* es un hongo clasificado como necrótrofo, prefiriendo infectar tejido dañado o en senescencia, causando la muerte del tejido (Jarvis, 1962). y la formación de masas de esporas al final del ciclo de infección (Bernal *et al.*, 2019). Es una de las enfermedades que causa más problemas en los cultivos de fresa. El hongo afecta las partes aéreas de la planta como son las flores, frutos (maduras), hojas y tallos (Schumacher, 2012). En el caso del fruto de la fresa causa lesiones grandes de color marrón con mayor frecuencia en el pedúnculo. El moho gris es transmitido por el aire. Una clave para su diagnóstico es presencia de micelio gris en frutas podridas (Mass, 1998).

#### 1.3.3.6 Marchitez causada por *Verticillium dahliae*

Este hongo es uno de los patógenos que causan enfermedades severas en el cultivo de fresa (Ellis, 2008). Forma conidios y microesclerotidos que germinan en presencia de los exudados de las raíces lo cual propicia su germinación y colonización. Puede persistir en la segunda forma de conidio en tejidos muertos y estar presente en el suelo hasta por 10-14 años (Klosterman *et al.*, 2009; Cockerton *et al.*, 2019). Es un patógeno que debe ser tratado de manera eficiente para su control, ya que si este se establece en el cultivo puede prevalecer en el suelo e infectar los sucesivos cultivos. La sintomatología desarrollada por la enfermedad muestra manchas de color marrón en los peciolo y las venas de las hojas más viejas se vuelven de tono marrón oscuro. Las hojas nuevas no se desarrollan y se vuelven amarillentas (Chong *et al.*, 2020).

Recientemente se ha visto la aparición de especies de los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* causando enfermedades asociadas a la pudrición de la raíz y corona en el cultivo de fresa en varias partes del mundo. A continuación, se describen detalladamente dichos géneros, enfatizando en su morfología y su ciclo de vida.

## 2. Generalidades del género *Neopestalotiopsis*

### 2.1 Historia

En 1839, De Notaris introdujo el género *Pestalotia*, basado en la cepa tipo *Pestalotia pezizoides* y aislado de *Vitis vinifera* en Italia; especie que se caracteriza por tener conidios de seis células con las cuatro centrales medianas de tonalidad olivácea y con células terminales hialinas y apéndices simples o ramificados que surgen del ápice (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). *Pestalotia* fue considerado un género monofilético (Jewoon, 2002).

En 1949, Steyaert se basó en la forma de los conidios y dividió *Pestalotia* en tres géneros: *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* y *Truncatella*; el primer género con conidios de seis células, el segundo de cinco células y el tercero con cuatro células. Posteriormente dividió el género *Pestalotiopsis* en *Monosetulatae*, *Bisetulatae*, *Trisetulatae* y *Multisetulatae*, según el número de apéndices apicales y además hizo una subdivisión basada en el color de los conidios, poniendo el nombre de concolor a aquellos que poseen células medianas igualmente pigmentadas y versicolor los que tienen dos células medianas superiores más oscuras que la célula mediana inferior (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

La morfología de los conidios y la pigmentación de las células medianas como lo reconoció Steyaert (1949) fue un rasgo importante a tomar en cuenta en la identificación y clasificación de *Pestalotiopsis*. Sin embargo, aún existían dudas respecto a la importancia de este rasgo a la hora de delimitar especies. Diversos estudios mostraban resultados diferentes respecto a esta característica. En 1974, Griffiths y Swart consideraron la pigmentación de las células medianas como un rasgo importante en la taxonomía de *Pestalotiopsis funerea* and *P. trisetata* al estudiar aislados de *Pinus armandii* y *Ribes sp.*, ellos sugirieron que la pigmentación era un rasgo confiable para la clasificación inter-específica. Sin embargo, los resultados de Poruhit y Bilgrami (1969), Satya y Saksena (1984) y Wei *et al.* (2006) mostraron que este rasgo era cambiante dependiendo de los medios empleados, del huésped y del número de generaciones. Por lo que concluyeron que no era un rasgo fiable (Liu *et al.*, 2010).

*Pestalotiopsis* es un género asexual con diversas especies con conidios portadores de apéndices en *Amphisphaeriaceae* (Barr, 1975; Lee *et al.*, 2006) y ampliamente distribuidos. Mayoritariamente son especies no sexuales y organismos fitopatógenos que causan enfermedades en varios cultivos, reduciendo la producción y, por tanto, causando una pérdida económica a los agricultores. Sin embargo, también se han aislado especies endófitas (Liu *et al.*, 2009, Wei *et al.*, 2007) y otras

capaces de producir compuestos de aplicación médica, agrícola e industrial (Aly *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014). Además, se ha visto que persisten en los tejidos como saprófitos (Hu *et al.*, 2007; Maharachchikumbura *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2008a).

Estudios previos de filogenia muestran que especies de *Pestalotiopsis* se agrupan en tres clados fuertemente sustentados que se basan en los tipos de conidios; aquellos con células medianas de color marrón pálido u oliváceo, otras de tono versicolor y otras de color oscuro (Jeewoon *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010; Maharachchikumbura *et al.*, 2011, 2012).

Los estudios moleculares se han usado para identificar y clasificar de las especies de *Pestalotiopsis* de una forma más exacta. Jeewon *et al.* (2003) estudiaron la importancia filogenética de los caracteres moleculares basándose en el análisis de la región ITS. Además, en 2007 Hu *et al.* analizaron datos combinados de las secuencias de la región ITS y el gen de la tubulina  $\beta$  y concluyeron que estas combinaciones resolvían más adecuadamente las relaciones taxonómicas (Liu *et al.*, 2010).

Maharachchikumbura *et al.* en 2014, señalan que la filogenia resolvió a *Pestalotiopsis* como un clado distinto en *Amphisphaeriaceae*, compuesto de tres grupos bien sustentados que se correlacionaban por la morfología. Además de *Pestalotiopsis*, se propusieron dos nuevos géneros, *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. Varias especies ya conocidas se asignaron en los nuevos géneros debido a que se hicieron análisis filogenéticos de secuencias combinadas de las regiones ITS, de un fragmento del gen  $\beta$ -tubulina (TUB) y regiones del gen del factor de elongación de la traducción 1-alfa (TEF) y sin dejar de lado con la morfología de los conidios. De esta manera se aclararon los límites de las especies en los tres géneros.

Como se mencionó anteriormente, los estudios filogenéticos separaron a *Neopestalotiopsis* como un nuevo género distinto de *Pseudopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis*, esto debido a que los alineamientos de la región ITS de las especies de *Pestalotiopsis* revelan tres grupos con diferente longitud en su región ITS: *Neopestalotiopsis*, *Pestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*, teniendo cada grupo una longitud de 480-484, 489-495 y 536-540 pb, respectivamente. Además, morfológicamente se distinguió a *Neopestalotiopsis* de los otros dos porque las células medianas eran de tipo versicolor y también porque los conidióforos no se distinguían y a menudo se reducían a células conidiógenas (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

## 2.2 Género *Neopestalotiopsis*

El género *Neopestalotiopsis* presenta conidiomas acervulares o picnidiales, subglobosos, globosos, de color marrón oscuro a negro, exudando conidios de color marrón oscuro a negro en una masa viscosa y globosa. Los conidióforos no se distinguen y a menudo se reducen a células conidiógenas que son discretas, cilíndricas, ampuliformes, hialinas, lisas y de paredes delgadas. La conidiogénesis inicialmente es holoblástica. Los conidios son fusoides, de elipsoides a subcilíndricos, rectos a ligeramente curvados. Las células basales son de cónicas a subcilíndricas, con base truncada, hialinas o de color marrón pálido a oliváceas, delgadas, rugosas, y de paredes lisas, además cuentan con un apéndice simple, tubular, no ramificado y céntrico. Los conidios cuentan tres células medianas, con pared rugosa a verruculosa, son versicolores, con septos más oscuros que el resto de la célula. Las células apicales son hialinas, de cónicas a cilíndricas, de paredes delgadas y lisas, con apéndices apicales tubulares, de uno a varios, filiformes o atenuados, ramificados o no ramificados (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

*Neopestalotiopsis rosae* en medio PDA tiene conidiomas picnidiales, globosos, solitarios, semiinmersos, de color marrón oscuro a negro, de 100 a 300  $\mu\text{m}$  de diámetro y con masas conidiales exudantes. Los conidióforos son indistintos, a menudo reducidos a células conidiógenas; las cuales son discretas, cilíndricas, hialinas, de paredes lisas, simples, que proliferan de 2 a 4 veces de forma percurrente y que se estrechan hacia un ápice truncado con engrosamiento periclinal visible. Los conidios son fusoides, elipsoides, rectos a ligeramente curvados, las células basales son cónicas con una base truncada, hialinas, rugosas y de paredes delgadas, a menudo con un apéndice oblicuo corto que se proyecta desde la base contiguo al punto de unión del apéndice basal; los conidios también tienen tres células medianas rugosas, de tonalidad versicolor (segunda célula desde la base es de color marrón pálido, la tercera es de color marrón miel y la cuarta color marrón) con septos más oscuros que el resto de la célula y finalmente la célula apical es hialina, cilíndrica, de paredes delgadas y lisas; con 3–5 apéndices apicales tubulares, que no surgen de la cresta apical, pero cada uno se inserta en un lugar diferente en la mitad superior de la célula apical, no ramificados. En medio PDA las colonias alcanzan 30–40 mm de diámetro después de 7 días a 25 °C, con borde lobulado, de color blanco o amarillo pálido, con micelio aéreo moderado en la superficie con conidiomas concéntricos negros y al reverso de color similar (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

### 2.3 Ciclo de vida de *Pestalotiopsis*

Estudios han mostrado que especies de *Pestalotiopsis* causan una variedad de enfermedades en diversos cultivos incluyendo lesiones cancrosas, muerte de brotes, manchas foliares, tizón de las agujas, tizón gris, tizón de las puntas, clorosis severa, pudrición de frutos, entre otros (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Sousa *et al.* (1978) consideraban a las especies de *Pestalotiopsis* como patógenos débiles u oportunistas, que causaban poco daño en plantas ornamentales. Sin embargo, Hopkins y McQuilken (2000) pronunciaron que algunas especies pueden causar daños severos en plantas cultivadas en maceta. El número de enfermedades a causa de estas especies va en aumento (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Recientemente se han visto a especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* causando daños severos en varios tejidos de cultivos de berries, en plantas ornamentales, en cultivos de té y otros frutos en varias partes del mundo (Jayawardena *et al.*, 2015; Bhagariya y Prajapati, 2019; Carvalho *et al.*, 2019; Gerardo-Lugo *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2021; Wilailuck *et al.*, 2021; Prasannath *et al.*, 2021; Araujo *et al.*, 2023; Pandey *et al.*, 2023).

Primeramente, las especies patógenas de *Pestalotiopsis* entran en contacto con el huésped (plantas heridas o estresadas) donde ocurrirá la infección (inóculo), posiblemente mediante conidios o esporas fragmentadas (Espinoza *et al.*, 2008). Los cuales pueden sobrevivir aun en condiciones adversas y causan las infecciones primarias. El inóculo secundario producido en el tejido enfermo puede causar infecciones secundarias más severas y aumentar la gravedad de la enfermedad. Marachchikumbura *et al.*, 2011 sospechan que especies endófitas permanecen latentes y asintomáticas en las plantas hasta que estas se estresan y se propicia la conversión a especies patógenas. La fase patogénica puede desencadenarse por diversos factores ambientales tanto estreses bióticos o abióticos, así como la susceptibilidad de la planta y la virulencia del patógeno (Sousa, Tavares y Lino-Neto, 2004; Sun *et al.*, 2021).

El ciclo de vida de especies de *Pestalotiopsis* se puede apreciar en la figura 3 y se lleva a cabo mediante cuatro etapas. En 2000 Watanabe *et al.*, estudiaron la adhesión de conidios de *P. negligencia* y su germinación y mostraron que la infección se daba en cuatro etapas. El primer paso lo lleva a cabo la célula mediana inferior ya que germina y queda firmemente adherida al sustrato. Además, la matriz mucilaginosa que recubre a los conidios logra una adhesión débil. Después se produce una segunda adhesión débil en las bases del pedicelo. La tercera etapa consta de la

producción y liberación de sustancias adhesivas fibrilares a lo largo del pedicelo hasta el ápice de la célula basal y en ocasiones también se liberan estas sustancias en los apéndices apicales.

Finalmente, en la cuarta etapa también se liberan estas sustancias, pero en el punto de aparición del tubo germinal.

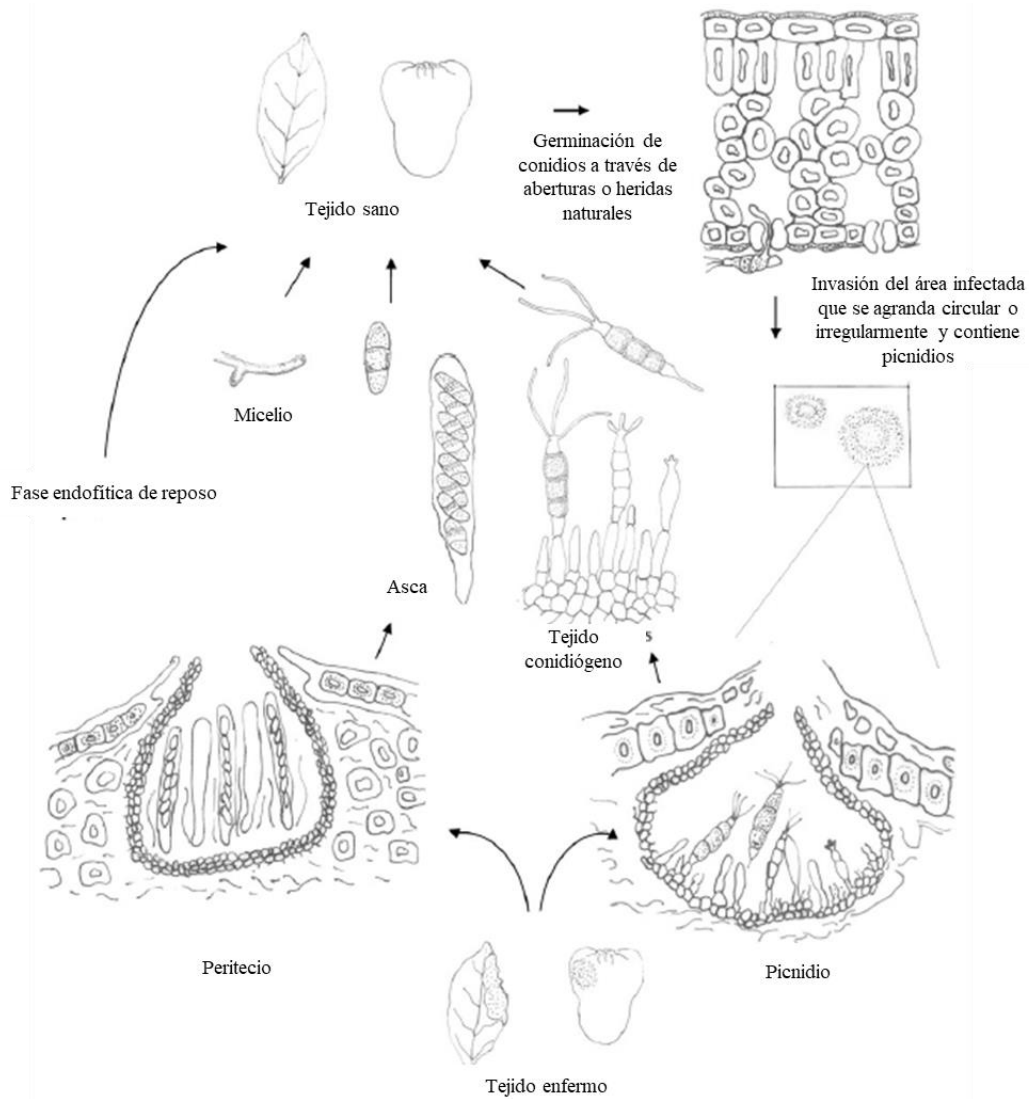


Figura 3. Ciclo de enfermedad del género *Pestalotiopsis*. (Recuperado y traducido de Machchikumbura et al. 2011).

La lluvia es uno de los principales medios de diseminación del hongo *Neopestalotiopsis* spp. ya que al estar en contacto con los acérvulos ocasiona la liberación de las esporas, los cuales pueden iniciar la infección en los tejidos vulnerables o cuando cuentan con agua libre sobre su superficie (Rebollar-Alviter et al., 2020; Baggio et al. 2021). El material propagativo obtenido de los viveros se especula que ha sido el principal medio en la dispersión de la enfermedad en varias partes del mundo (Acosta, 2022).

Las especies del género *Neopestalotiopsis* pueden causar enfermedades bajo diferentes condiciones debido a su amplia adaptabilidad. Sin embargo, la intensidad de la enfermedad se ve favorecida a temperatura entre 23-27°C y con una humedad relativa de 95-100% (Rebollar-Alviter *et al.* 2020; Dung *et al.* 2006; Citado por Acosta, 2022).

Al ser una enfermedad emergente aún existe poca información acerca de su manejo en los cultivos de fresa. Pocos son los trabajos donde se ha estudiado el efecto de algunos fungicidas de manera *in vitro* e *in vivo*, mostrándose efectos positivos. En 2018, Essa *et al.* reportaron en sus ensayos *in vitro* que al emplear thiram e hymexazole se inhibió el crecimiento micelial de *N. rosae* a 1000 y 1250 ppm, respectivamente. Así mismo, en sus resultados *in vivo* demostraron que el primer fungicida redujo la incidencia de la enfermedad con alrededor del 82% de efectividad y el segundo con casi el 80%. Obregón *et al.* (2018) investigaron la sensibilidad de *Neopestalotiopsis clavispora* de forma *in vitro* con varios fungicidas, mostrando que cyprodynil + fludioxonil, boscalid + pyroclastrobin y azoxstrobina + difenoconazole, fueron considerados como los mejores fungicidas para su control (Citado por Moyolema, 2022). En otro experimento, al evaluar 38 aislamientos de *Neopestalotiopsis* sp. con diferentes fungicidas se señaló que el captan y el fludioxonil inhibieron el crecimiento micelial (Baggio *et al.*, 2019). En 2020, Rebollar-Alviter *et al.*, mostraron que *N. rosae* presentó sensibilidad a cyprodinil + fluodioxonil, captan, iprodiona, difeconazole y procloraz en un 100% (Acosta, 2020). Otro trabajo mostró que fludioxonil, tebuconazol, fluazinam y thiram, de un total de 12 fungicidas tuvieron los mejores resultados para la inhibición de la germinación *in vitro* de *Neopestalotiopsis mesopotámica* (Moyolema, 2022).

El conocimiento del agente causal y su ciclo de vida o de enfermedad, permite la implementación de estrategias de control para la enfermedad. Al igual que la interacción planta-patógeno y su variación funcional según diversos factores ambientales son puntos importantes para el manejo integral de las enfermedades usando métodos de cultivo, junto con el uso de productos químicos y biológicos (Rebollar, Acosta y Silva, 2024).

### 3. Organismos endófitos como agentes biocontroladores

Los productores agrícolas se enfrentan continuamente a problemas fitopatológicos y de plagas, afectando el rendimiento y calidad del cultivo y, por tanto, teniendo pérdidas económicas severas. Por décadas se ha empleado el uso de pesticidas químicos, que debido a su composición resultan ser tóxicos e inespecíficos, causando severos efectos secundarios a la salud humana y al medio ambiente y además estudios recientes muestran la resistencia de algunos patógenos a dichos compuestos. Por ello la importancia de tener un buen manejo de los cultivos, buscando agentes antagonistas eficientes y compatibles con el medio ambiente. Recientemente el uso de microorganismos vivos como biocontroladores de patógenos de plantas se ha visto como una alternativa útil, a menor costo y sin efectos negativos a la salud humana ni al medio ambiente (Arroyave *et al.*, 2017; Hajek y Eilenberg, 2018; Morales, 2019; Lahlali *et al.*, 2022).

En 2001, Eilenberg define al control biológico como “el uso de organismos vivos para suprimir la población de un organismo patógeno, haciéndola menos abundante o dañina de lo que sería”.

La cantidad de estudios acerca de este tipo de microorganismos va en aumento. Se han visto logros prometedores por el uso de agentes de biocontrol antagonistas particularmente de géneros como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Streptomyces* spp., entre otros (Lahlali *et al.*, 2022), contra agente patógenos que causan enfermedades foliares y del suelo como *Agrobacterium radiobacter* var *radiobacter*, *Erwinia* spp., *Fusarium* spp., *Rhizotocnia solani*, *Phytophthora* spp., *Aspergillus* spp., *Phoma* spp. y *Pythium* spp. (Pérez-García, Romero y De Vicente, 2011; O’Brien, 2017; Lahlali *et al.*, 2022). Adicionalmente, se ha visto que además de detener el crecimiento de los patógenos, muchos de los agentes de biocontrol promueven el crecimiento de las plantas (Lahlali *et al.*, 2022).

Los agentes de biocontrol pueden encontrarse principalmente en la rizósfera, otros son bacterias de promoción del crecimiento vegetal y estudios recientes muestran que organismos endófitos de plantas también tienen esta cualidad (Mei *et al.*, 2021; Lahlali *et al.*, 2022).

Ryan *et al.* (2008) dice que una bacteria endófitas habita diferentes tejidos de la planta y no es patógena con su huésped (Muhammad *et al.* 2014). Hardoim *et al.* (2015) mencionan que el término endófito se refiere únicamente al hábitat e incluye a todos los microorganismos que en alguna parte o toda su vida colonizan los tejidos internos de la planta (Compant *et al.*, 2021).

Las plantas proporcionan el hábitat y nutrientes a los organismos endófitos sin perjudicarles. Mientras que los endófitos las benefician al mejorar su adaptación y crecimiento mediante la producción de hormonas del crecimiento, la adquisición de nutrientes y una mejor respuesta a la resistencia de una variedad de estreses bióticos y/o abióticos; incluida la inhibición de patógenos (Pavithra *et al.*, 2020; Mei *et al.*, 2021).

La producción de antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, enzimas líticas, sideróforos y otros metabolitos secundarios por los agentes de biocontrol son los medios para la inhibición de los fitopatógenos, además de la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y resistencia inducida, previniendo así el desarrollo de las enfermedades (Patel *et al.*, 2016; Lahlali *et al.*, 2020; Lyousfi *et al.*, 2021, Gupta y Saxena, 2023).

Diversos son los trabajos donde se ha visto el efecto de organismos endófitos contra fitopatógenos, algunos se describen a continuación:

Kim *et al.* (2007) usaron *B. licheniformis* N1 para controlar *Botrytis cinerea*, mostrando que el bacilo previno la aparición de la enfermedad, al inocularse tres veces antes de la infección con el hongo. Tortora *et al.* (2011) muestran que la producción de sideróforos por *Azospirillum brasilense* inhibe la antracnosis causada por *C. acutatum*. En el caso se Cha *et al.* (2016) aíslan *Streptomyces* sp. S4-7 y encontraron que la severidad de la marchitez por *Fusarium* disminuye en cultivos comerciales (Citados en Mei *et al.*, 2021).

Recientemente, Mei *et al.* (2021) evaluaron el efecto de biocontrol con tres cepas de *Bacillus velezensis* IALR308, IALR585 y IALR619 contra *Collectotrichum gloeosporioides* en condiciones de invernadero. Los resultados señalaron que, al inocular los bacilos en plantas de fresa se reduce la enfermedad causada por el hongo. Y además son capaces de producir auxinas y solubilizar fosfato mostrando cualidades de promoción del crecimiento.

Y dentro de estos trabajos, hay algunos organismos endófitos que se han aislado de plantas de fresa y que se ha visto que podrían emplearse como agentes de biocontrol, entre ellos:

Zahra *et al.* (2020) aislaron tres bacterias endófitas de la tallo y hojas de la fresa que fueron identificadas como *Bacillus* spp., y evaluaron su actividad antagonista contra *Colletotrichum nymphaeae* de manera *in vitro*, *in vivo* y en condiciones de invernadero. Se observó que inhibieron el crecimiento del fitopatógeno mediante compuestos volátiles producidos por los aislados. Su efecto en las plantas mostró que se redujo la severidad de la enfermedad cuando se inocularon las

plantas con los aislados, previniendo el crecimiento del hongo en las tres formas evaluadas. En otro trabajo, se aislaron seis bacterias de hojas y raíces de plantas de fresa. Se estudió el efecto antagonista de los aislados contra *Botrytis cinerea* mediante las técnicas de cultivo dual y cultivo invertido observando la producción de compuestos antifúngicos difusibles en la primera técnica y volátiles en la segunda. Los resultados mostraron que mediante la producción de antifúngicos difusibles se inhibe el crecimiento en un 80% y cuando son los compuestos volátiles en un 90%. La identificación de los aislados mostró que, de los seis; cinco pertenecieron al género *Bacillus* spp. y uno a *Pantoea* sp. (Doin de Moura *et al.*, 2021).

## Justificación

La fresa es un fruto con gran aporte nutricional y de gran valor comercial. México ocupa el primer lugar en exportación del fruto; siendo el Estado de Guanajuato el segundo lugar en su producción solo por detrás de Michoacán. Irapuato, municipio del Estado de Guanajuato conocido como “La capital mundial de las fresas”, es de los municipios que más aportan en la producción estatal. Sin embargo, recientemente la producción del fruto disminuyó de manera significativa en varios municipios del Estado (incluido Irapuato) por la presencia de una enfermedad emergente conocida como “Pestaliota”, representando un desafío para los productores. Dado el impacto económico de la enfermedad es importante encontrar estrategias de control efectivas contra la enfermedad y así ayudar a mantener la productividad de los cultivos, utilizando estrategias agroecológicas que minimicen el impacto negativo en el ambiente.

## Hipótesis

*Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. será el principal agente causal de la podredumbre de la raíz y corona en el cultivo de fresa en el Estado de Guanajuato.

Algún organismo endófito de la fresa antagonizará de manera *in vitro* e *in vivo* a hongos del género *Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. causante de la podredumbre de la raíz y corona en el cultivo de fresa en el Estado de Guanajuato.

# Objetivos

## General

Identificar y caracterizar el hongo del género *Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. asociado a la enfermedad “Pestaliota” en el cultivo de fresa en el Estado de Guanajuato, así como evaluar el efecto de los endófitos en el control biológico de manera *in vitro* e *in vivo*.

## Específicos

1. Aislar, identificar y caracterizar al hongo *Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. asociado a la enfermedad “Pestaliota” en el cultivo de fresa en el estado de Guanajuato.
2. Verificar que *Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. causa la enfermedad “Pestaliota” mediante los postulados de Koch.
3. Aislar, identificar y caracterizar hongos y bacterias endófitas con actividad antagonista *in vitro* sobre *Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. causante de la “Pestaliota” en la fresa.
4. Evaluar el antagonismo *in vivo* de los organismos endófitos sobre *Neopestalotiopsis* sp. y/o *Pestalotiopsis* sp. causante de la “Pestaliota”.

## Materiales y métodos

1. Aislamiento del supuesto hongo fitopatógeno y de los organismos endófitos presentes en la fresa.

Las plantas de fresa usadas en este trabajo correspondían a la variedad “Camino Real” y eran afectadas por una enfermedad emergente conocida coloquialmente como “Pestalotia”, las plantas fueron colectadas en la comunidad de Los Nicolás en la Ciudad de Irapuato, Guanajuato México. La recolección fue hecha al azar tomando cinco plantas de fresa con síntomas y cinco plantas que no mostraban síntomas aparentes. Una vez que las plantas fueron colectadas, se transportaron en hieleras al Laboratorio de Producción y Caracterización de Biológicos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla para su posterior estudio.

2. Aislamiento del hongo fitopatógeno

A partir de las plantas enfermas o con síntomas aparentes de la enfermedad “Pestalotia” se tomaron completamente al azar pedazos de tejido de raíz, corona y follaje (hojas). Estos se colocaron en cámaras húmedas, las cuales consistían en cajas Petri de vidrio de 20 cm que tenían papel filtro humedecido con agua destilada estéril y además un pedazo de algodón mojado también con la misma agua y se colocaron diferentes trozos de tejidos. Las cámaras húmedas se pusieron en la incubadora a 28-30°C hasta presentar crecimiento de micelio con características de interés.

Por otro lado, trozos pequeños (aproximadamente de 5 mm) de los tejidos mencionados anteriormente se colocaron en un tubo falcón de 50 mL y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio (NaOCl 2%) por 2 min en agitación. Después se vació este y se le agregó alcohol al 70% en agitación por 30 min. Enseguida se desechó el alcohol y se lavaron los tejidos 4 veces con agua destilada estéril (ADE), los trozos se secaron en papel estéril. Finalmente, los trozos de tejido se colocaron en cajas de medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 28-30°C hasta la aparición del micelio con las características morfológicas buscadas. Con este procedimiento también se aislaron otros hongos. Posteriormente se hicieron varias siembras a medio fresco para su purificación.

3. Aislamiento de los organismos endófitos

Para este caso, de las cinco plantas sanas se tomaron trozos de tejido de raíz, tallo, follaje y fruto de manera completamente al azar. Se peso 1 g de cada uno de los tejidos y se hizo una esterilización

superficial colocando los trozos en tubos falcón de 50 mL, y añadiéndoles NaOCl al 2% y agitándolos por dos min. Terminado el tiempo se desechó el hipoclorito y se añadió alcohol al 70% agitándolos por 30 s. Finalmente se lavaron cuatro veces con ADE. Posteriormente se trituraron en morteros estériles con cinco mL de ADE, todo por separado. Una vez bien triturados los tejidos se recolectó un mL del extracto y se hicieron diluciones  $10^1$  y  $10^2$ , 100  $\mu$ L de las diluciones se sembraron por extensión con varilla de vidrio en placas de diferentes medios (PDA, agar nutritivo y citrato de Simmons); esto con la finalidad de aumentar la diversidad de microorganismos aislados (figura 4).

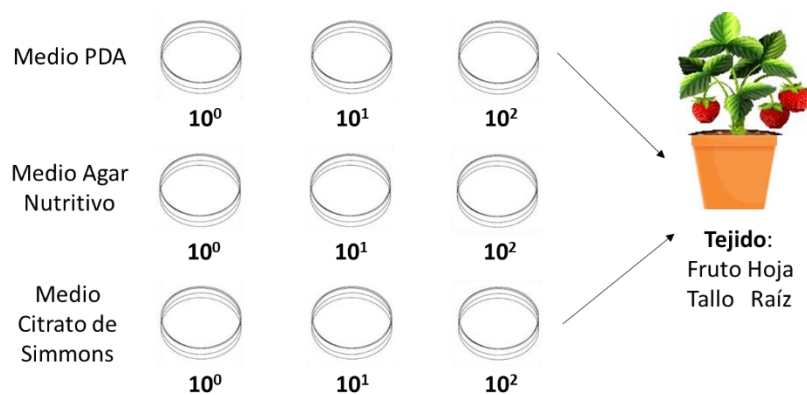


Figura 4. Metodología empleada para el aislamiento de organismos endófitos de diferentes tejidos de la fresa.

Las cajas se incubaron a  $29^{\circ}\text{C}$  hasta la aparición de colonias bacterianas y fúngicas; aquellas con diferentes morfologías macroscópicas se purificaron tras varias siembras.

Todos los microorganismos aislados fueron criopreservados en glicerol al 50% y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Primero se crecieron toda la noche en caldo LB y posteriormente se mezclaron 500  $\mu$ L de ese caldo con 500  $\mu$ L de glicerol al 50%, para cada uno de los aislados y guardando cinco tubos por aislado.

#### 4. Identificación parcial de los organismos

La identificación parcial de todos los organismos aislados tanto de las plantas enfermas como las sanas, se hizo mediante morfologías macroscópicas y microscópicas. En el caso de los hongos se usaron las tablas taxonómicas de Barnett y Hunter (1972). Y para las bacterias se hizo tinción de Gram para diferenciar entre Gram + o Gram -.

## 5. Postulados de Koch

Con el supuesto hongo fitopatógeno que cumplió con las características macro y microscópicas esperadas y porque se aisló de las plantas enfermas se procedió a verificar si era el agente causal de la enfermedad “Pestalotia” asociada a la podredumbre de la raíz y corona de la fresa.

Para ello, se consiguieron plantas de fresa de var. Minognette de seis y 12 meses de edad se inocularon con el hongo. Las plantas provenían de un invernadero de Atlixco, Puebla. Tres plantas de cada edad se inocularon mediante el método de punción (Intrago, 2020; Vallejo, 2021) que consistió en realizar una herida con una aguja estéril en la base de la corona y enseguida inocular 1 mL de una suspensión de esporas de  $1-1.5 \times 10^6$  esporas/mL. Después de 10 días se hizo una segunda inoculación, bajo las mismas condiciones. Otras tres plantas se inocularon por medio de aspersión al follaje, para este caso un mL de la suspensión de esporas antes mencionada fue mezclado con cuatro mL de agua con el fin de tener un volumen total de cinco mL y este fue asperjado en el follaje de las plantas. Como control negativo se aplicó agua a un grupo de tres plantas.

Se inspeccionaron las plantas todos los días hasta la aparición de síntomas característicos de la enfermedad “Pestalotia”. Después de tres meses se inspeccionó la corona para observar si había daño aparente. La evaluación de los síntomas de la enfermedad se hizo de manera cualitativa, comparando los síntomas de las plantas enfermas control las plantas control.

Posteriormente se procedió a reaislar el hongo mediante la esterilización superficial (antes mencionada) de tejido de raíz, corona y follaje. Y se colocaron trozos de estos en medio PDA, con el fin de verificar si se tenían las mismas características del hongo inoculado.

## 6. Caracterización molecular del hongo fitopatógeno y de los organismos endófitos con actividad antagonista

La caracterización molecular de los hongos fitopatógenos y los organismos endófitos con actividad antagonista se realizó mediante la secuenciación de regiones de genes conservados, seguido de in análisis filogenético. En el caso de los hongos se usaron: la región ITS y las secuencias de los genes del factor de elongación  $1\alpha$  “TEF” y del gen  $\beta$ -tubulina “TUB” (Essa, *et al.*, 2018; Sun, *et. al*, 2021; Daengsuwan, *et. al*, 2021; Acosta, 2022). Para el caso del aislado bacteriano con actividad antagonista se usó el gen del RNA ribosomal 16S.

La extracción de DNA de las muestras (hongos y bacterias) se realizó con el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH). Una vez obtenido el DNA se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez comprobada la integridad se procedió a realizar las amplificaciones de los fragmentos génicos correspondientes.

La amplificación de los genes se realizó mediante PCR a partir de un volumen de reacción de 10 µL, la cual contenía: 5 µL de PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.4 µL de la mezcla de oligonucleótidos (Fw+Rv), 4.1 µL de agua libre de endonucleasas y 0.5 µL de DNA templado. Los oligonucleótidos empleados y las condiciones de las PCR se muestran en la tabla 1.

El producto de PCR fue visualizado mediante electroforesis de gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tri-Borato-EDTA), las condiciones de la electroforesis fueron de 30 min a 90 V.

Los productos de PCR se purificaron mediante el kit DNA Clean & Concentration™ de la marca Zymo; su calidad y cantidad se determinó considerando las absorbancias a 260 y 280 nm usando el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) y fueron enviados a secuenciar a la Unidad Genómica Avanzada del Langebio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Cinvestav Unidad Irapuato, Guanajuato.

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones de PCR empleadas para la amplificación de los genes de interés.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Condiciones de PCR	Gen	Tamaño	Referencia
<b>FungFw</b>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	3' 95°C, x30 (15" 95°C,	Región	550 pb	White et al., 1990
<b>FungRv</b>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	15" 56°C, 35" 72°C), 5' 72°C	ITS		
<b>FwBt2a</b>	GGTAACCAAATYGGTCTGCTGCTTC	3' 95°C, x35 (15" 95°C,	tub2	500 pb	Glass & Donaldson, 1995
<b>RvBt2b</b>	ACCCTCAGKKKAGTGACCCTTGCC	15" 65°C, 40" 72°C), 5' 72°C			
<b>EF1-728F</b>	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	3' 95°C, x30 (15" 95°C,	tef	500 pb	O'Donell et al., 1998; Carbone & Kohn, 1999
<b>EF2</b>	GGARGTACCAGTVRWCATGTTC	15" 56°C, 35" 72°C), 5' 72°C			
<b>UN27F</b>	TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	3' 95°C, x30 (15" 95°C,	16S	1300	Wernegreen & Riley, 1999; Willems et al., 2003
<b>UN1392 R</b>	CAGGGGGCGGTGTGTACA	15" 52°C, 100" 72°C), 5' 72°C	rDNA	pb	

Para el análisis filogenético, las secuencias de DNA obtenidas fueron ensambladas para generar la secuencia consenso de cada gen usando el programa Geneious (versión 4.8.5, Biomatters Lid). Las secuencias conocidas de especies de *Pestalotiopsis/Neopestalotiopsis* fueron recuperadas del banco

de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), los números de accesión de cada una de las secuencias empleadas se encuentran en la tabla 2. El alineamiento múltiple se llevó a cabo con el programa CLUSTALX (versión 2.1, Desmond Higgins) y los alineamientos fueron posteriormente revisados y editados con BioEdit (versión 7.7.1, Thomas Hall). El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA11 La generación de los árboles filogenéticos se realizó con el programa MEGA11 (Rebollar-Alviter et al. 2020; Lawrence et al. 2023). Para el caso del hongo fitopatígeno se concatenaron los tres genes mediante el programa Mesquite (versión 3.81, Fellowship) y el árbol se construyó mediante inferencia Bayesiana (Rebollar-Alviter *et al.*, 2020; Fernández *et al.*, 2023; Chandana *et al.*, 2024). Para el organismo endófito se hizo mediante el modelo de Mínima Evolución, elaborado también en MEGA 11.

### 7. Actividad antagonista *in vitro*

La actividad antagonista de los organismos endófitos aislados fue evaluada mediante el método de cultivo dual modificado (Land *et al.*, 1997; Andrade-Hoyos *et al.*, 2019; Subbagounder *et al.*, 2020). El ensayo se realizó en placas de PDA colocando un círculo de 0.5 cm de micelio de *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 de cinco días de edad en el centro de la placa. Posteriormente se colocaron 15 µL de caldo bacteriano a 1.5 cm del borde del micelio, tal como se ilustra en la Figura 5.

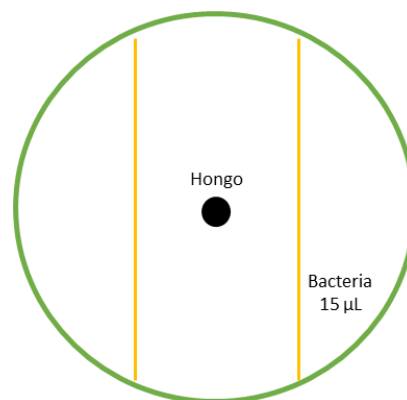


Figura 5. Representación del método de cultivo dual para el estudio de la actividad antagonista de los aislados endófitos.

Las placas se incubaron a 29°C hasta que el control creciera en toda la superficie de la placa (7 días). Como control se colocaron placas Petri inoculadas con el hongo sin bacteria.

La inhibición del crecimiento micelial se determinó mediante la fórmula:

$$\%Inhición\ del\ crecimiento = \frac{(R1 - R2)}{R1} * 100$$

Donde:

- **R1** es el diámetro del hongo en las placas de control.
- **R2** es el diámetro del hongo en las placas con interacción de los aislados bacterianos.

Estos ensayos se hicieron por duplicado para cada aislado contra el hongo de interés.

#### 8. Actividad de biocontrol *in planta*

La actividad de biocontrol de los organismos endófitos aislados que mostraron actividad antagonista *in vitro* fue evaluada *in planta*. Para ello, primeramente, un aislado elegido que mostró ser eficiente en la inhibición del fitopatógeno fue inoculado en caldo LB e incubado a 29°C a 150 rpm por 24 h, con el fin de obtener una concentración aproximada de un orden de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Posteriormente, tres plantas de seis meses de edad variedad Mignonette fueron inoculadas con un mL del caldo bacteriano en la base de la corona, esto se hizo un día antes de ser inoculadas con el hongo fitopatógeno.

La inspección de las plantas se realizó cada día hasta la aparición de síntomas característicos de la enfermedad “Pestalotia” y después de tres meses se inspeccionó la corona para ver su efecto. La evaluación de la actividad de biocontrol se hizo de manera cualitativa, apreciando síntomas o no y comparando los tratamientos contra el tratamiento control.

#### 9. Actividad de Promoción de Crecimiento

La producción de indoles totales fue evaluada empleando caldo Luria-Bertani adicionado con triptófano (100 µg/mL). El *Bacillus* sp. AFBCC fue inoculado en tubos de ensaye con el medio mencionado anteriormente y fue incubado a 30°C con agitación a 150 rpm por 48 h. Después del tiempo de incubación los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm por cinco min. Posteriormente se tomó un mL del sobrenadante y se colocó en otro tubo de ensaye y se hizo reaccionar con dos mL del reactivo Salkowsky (4 mL FeCl<sub>3</sub> 0.5 M, 60 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96% y 100 mL de agua destilada) por 20 min en la oscuridad. Terminado el tiempo se leyó la absorbancia de las muestras a 530 nm (Gordon y Weber, 1951). Para determinar la concentración en el medio se empleó una curva estándar con concentraciones conocidas (0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µg/mL) usando ácido indolbutírico como patrón. Las muestras se trataron por triplicado.

La solubilización de fosfatos se determinó empleando los medios Pikovskaya y NBRIP (ver tabla 3 del anexo). Se emplearon tres bacterias; *G. diazotrophicus* como control positivo, *Pseudomonas*

*putida* KT2240 y el *Bacillus* sp. AFHP1. Las cepas bacterianas se pusieron a crecer en medio LB, después de 48 h se inocularon 100  $\mu$ L de los caldos bacterianos en los medios Pikovskaya y NBRIP por extensión. Se inspeccionaron las cajas diariamente para observar la formación del halo transparente y/o el cambio de coloración como indicativo de la solubilización de fosfato.

## Resultados y discusión

El Estado de Guanajuato en el periodo de agosto 2021 a marzo de 2022 se vio afectado fuertemente por una enfermedad emergente conocida coloquialmente como “Pestalotia” que causo la pérdida de cultivos de fresa y, por tanto, una pérdida económica importante. Los síntomas vistos en el follaje consistían en coloración morada-cobrizo, que comenzaba en el borde de las hojas y se iba adentrando hacia el centro de las hojas marchitándolas y secándolas. También se presentaba la aparición de manchas tipo tizón y de forma concéntrica que con el paso de los días se observaba la aparición de “puntitos negros” conocidos como acérvulos. En cuestión de días la planta presentaba una marchitez general que propiciaba la desecación y muerte de las plantas. Además, se observaba necrosis en la base de la corona, y que al hacerse un corte longitudinal se observaba una coloración marrón-rojiza; por esta razón se asociaba a esta enfermedad con la pudrición de la corona.

En la figura 6 se muestran los síntomas de la enfermedad “Pestalotia” vistos en la localidad de “Los Nicolás” en el municipio de Irapuato, Guanajuato. A partir de las plantas enfermas llevadas al laboratorio se realizó el aislamiento de diversos hongos

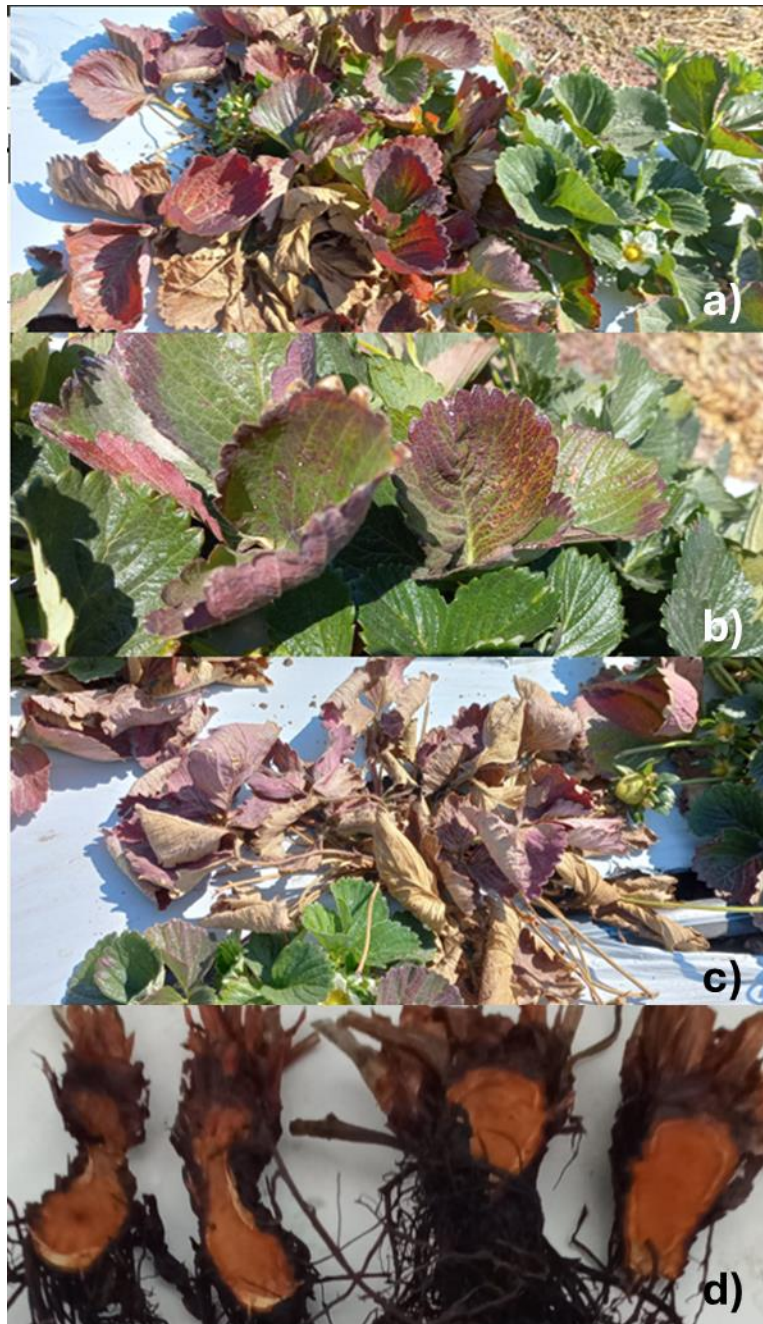


Figura 6. Plantas de fresa con síntomas de “Pestalotia”. a) Hojas con coloración rojo-morado de tono cobrizo; b) Síntomas que avanzan de las orillas de las hojas hacia el centro, también la presencia de manchas tipo tizón; c) Marchitez general de la planta; d) Pudrición de la corona, decoloración marrón-rojizo.

Después del procesamiento de tejidos enfermos se aislaron 10 hongos, de los cuales cinco mostraron las características del género *Neopestalotiopsis* sp. La identificación de los hongos a nivel de género se realizó comparando las características morfológicas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998); las colonias en PDA mostraron un crecimiento radial que alcanzaba su madurez a los siete días (es decir, que cubrían toda la superficie de la placa) a 28°C, con el micelio

de color blanco y de aspecto lanudo, de borde lobulado y roseta, con micelio aéreo moderado de tipo algodonoso. Después de los siete días se observa la aparición de cuerpos fructíferos de color negro (conidiomas) con disposición concéntrica. El reverso de la placa se observa de color amarillo pálido o beige. Los conidios se observaron de tipo fusiformes o elipsoides, conformados por 5 células; de las cuales las del centro presentan una tonalidad versicolor, es decir que presentaban diferentes tonalidades entre ellas. Las células basal y apical eran hialinas, las primeras presentaban un apéndice corto y las segundas con 3 o 4 apéndices largos (Figura 7).

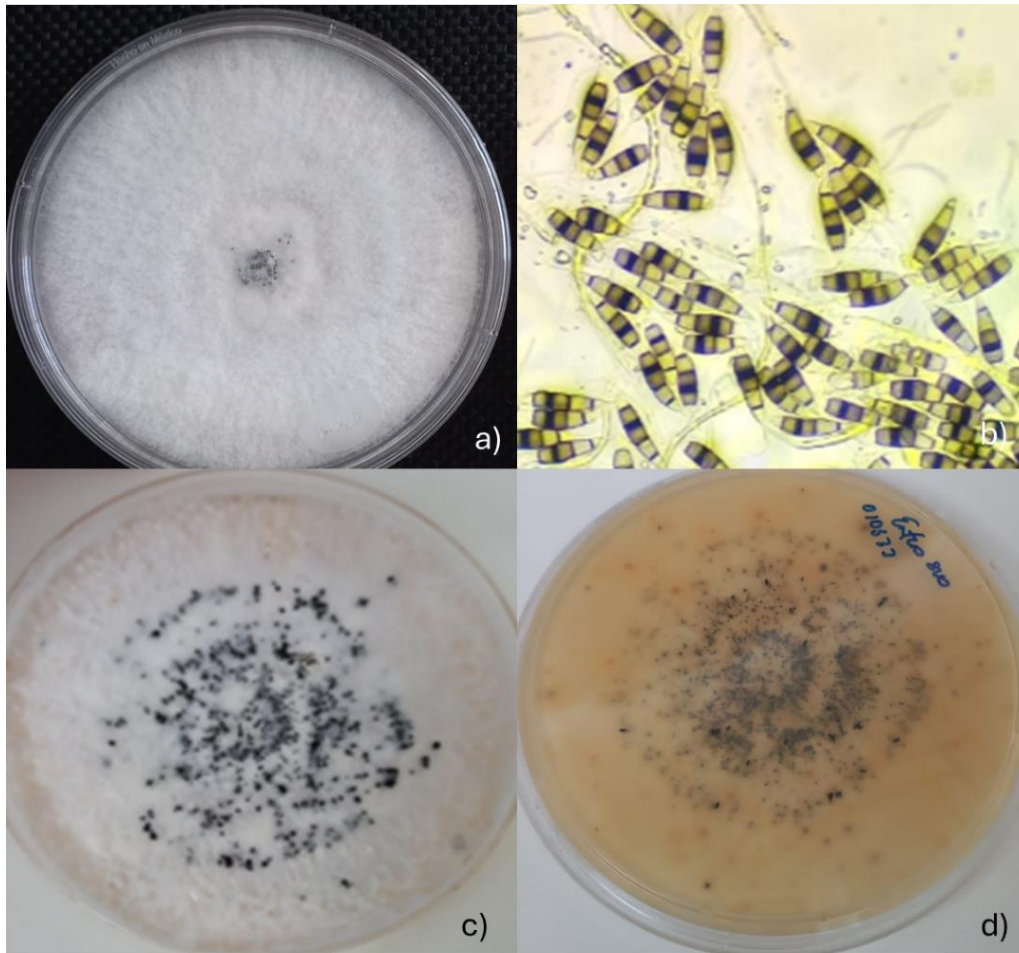


Figura 7. Morfología de *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 aislado de la fresa. a) Micelio blanco algodonoso y de aspecto lanudo, crecido en medio PDA y con 7 días de edad; b) Conidios de tipo fusiforme, con 5 células (las tres del medio de tonalidad versicolor, la célula basal y apical son hialinas y con un apéndice y 3 o 4 cada una de ellas, respectivamente); c) Conidioma, cuerpos fructíferos de color negro y concéntricos; d) Reverso de la placa, se observa una tonalidad beige o amarillo pálido.

Se seleccionó un aislado fúngico con las características de interés para seguir trabajando en las otras etapas del proyecto el cual fue denominado AFHP1. Según las características morfológicas mencionadas se sugiere que el aislado AFHP1 pertenece a *Neopestalotiopsis* sp., ya que sus características macro y microscópicas son similares a las mencionadas por Maharachchikumbura

*et al.*, 2014; Rebollar-Alviter *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Qian *et al.*, 2021, Baggio *et al.*, 2021, Durmus *et al.*, 2023; Chandana *et al.*, 2024). Sin embargo, lo que difiere entre ellas es el número de días para la aparición del conidiomata, ya que en algunas fuentes aparece a partir de los 7 días, otros hasta los 10; dichas variaciones podrían atribuirse a las condiciones de incubación/medio de cultivo.

Otros géneros que se aislaron de las plantas de fresa enfermas fueron *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. y *Trichothecium* spp., los cuales fueron identificados según las tablas taxonómicas antes mencionadas (ver anexo). La mayoría de estos hongos son saprófitos. Sin embargo, especies del género *Fusarium* son causantes de pudrición de raíz y eventualmente de la corona (Koike *et al.*, 2013; Pastrana *et al.*, 2019; Martínez, 2020; Vallejo, 2021).

Para la confirmación del género y revelar la especie del hongo *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 se hizo un análisis filogenético con las secuencias ITS, TUB y TEF. Los números de accesión para cada gen de cada especie empleada se muestra en la tabla 2

Tabla 2. Especies de *Neopestalotiopsis* y huéspedes de donde fueron aisladas usadas para el análisis filogenético, con sus números de accesión en el GenBank.

Especie	Cepa	Huésped	Lugar	Número de acceso en GenBank			Referencia
				ITS	Btub	EF1a	
<i>N. javensis</i>	CBS:257.31	<i>Cocos nucifera</i>	Indonesia	MH855207	KM199437	KM199543	Machchikumbura, 2014
<i>N. maddoxii</i>	BRIP 72266a	<i>Macadamia integrifolia</i>	Australia	MZ303782	MZ312675	MZ344167	Prasannath, 2021
<i>N. rosae</i>	CBS 101057	<i>Rosa sp.</i>	New Zealand	NR_145243	KM199429	KM199523	Machchikumbura, 2014
<i>N. mesopotamica</i>	CBS 336.86	<i>Pinus sp.</i>	Iraq	KM199362	KM199441	KM199555	Machchikumbura, 2014
<i>N. hydeana</i>	MFLUCC 20-0132	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Thailand	MW266069	MW251119	MW251129	Huanluek,2021
<i>N. rhizophorae</i>	MFLUCC 17-1551	<i>Rhizophora mucronata</i>	Thailand	MK764277	MK764343	MK764321	Norphanphoun,2019
<i>N. brachiata</i>	MFLUCC 17-1555	<i>Rhizophora apiculata</i>	Thailand	MK764274	MK764340	MK764318	Norphanphoun,2019
<i>N. rhizophorae</i>	ZJTH4	<i>Aegiceras corniculatum</i>	China	MW930308	MW927338	MW927340	Deng,2022
<i>N. hydeana</i>	MFLUCC 20-0127	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Thailand	MW266068	MW251118	MW251128	Huanluek,2021
<i>N. rosae</i>	CBS 124745	<i>Paeonia suffruticosa</i>	USA	KM199360	KM199430	KM199524	Machchikumbura, 2014
<i>N. rosae</i>	31-20-V7	<i>Fragaria x ananassa</i>	Italy	OR815650	OR810678	OR810646	Dardani, 2023
<i>N. formicarum</i>	CBS 362.72	Dead Formicidae (ant)	Cuba	MH860500	KM199455	KM199517	Machchikumbura, 2014
<i>N. eucalypticola</i>	CBS 264.37	<i>Eucalyptus globulus</i>	N/A	KM199376	KM199431	KM199551	Machchikumbura, 2014
<i>N. piceana</i>	SAUCC210113	Soil	China	OK149225	OK206435	OK206437	Zhang, 2022
<i>N. piceana</i>	CBS 394.48	<i>Picea sp.</i>	UK	KM199368	KM199453	KM199527	Machchikumbura, 2014
<i>N. australis</i>	KNU16-005	Soil	Korea	KY398730	KY398731	KY398732	Park, 2016
<i>N. australis</i>	Na_12	<i>Pinus pinea</i>	Turkey	OR673076	OR682641	OR682639	Cakar, 2023
<i>N. clavispora</i>	MFLUCC12-0280	<i>Magnolia sp.</i>	China	JX398978	JX399013	JX399044	Machchikumbura, 2012
<i>N. clavispora</i>	DJ02	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	China	MT361101	MT367332	MT367331	Jiang, 2021
<i>N. asiatica</i>	MFLUCC 12-0286	<i>Prunus dulcis</i>	China	JX398983	JX399018	JX399049	Machchikumbura, 2014
<i>N. cubana</i>	CBS 600.96	Leaf Litter	Cuba	KM199347	KM199438	KM199521	Machchikumbura, 2014
<i>N. foedans</i>	CGMCC 3.9123	Mangrove plant	China	JX398987	JX399022	JX399053	Machchikumbura, 2012
<i>P. camelliae</i>	MFLUCC 12-0277	<i>Camellia japonica</i>	China	JX399010	JX399041	JX399074	Machchikumbura, 2012
<i>P. rosea</i>	MFLUCC12-0258	Dead plant material	China	JX399005	JX399036	JX399069	Machchikumbura, 2012

El análisis filogenético mostró un agrupamiento con las especies *N. rosae*, *N. mesopotámica* y *N. clavispora* (figura 8).

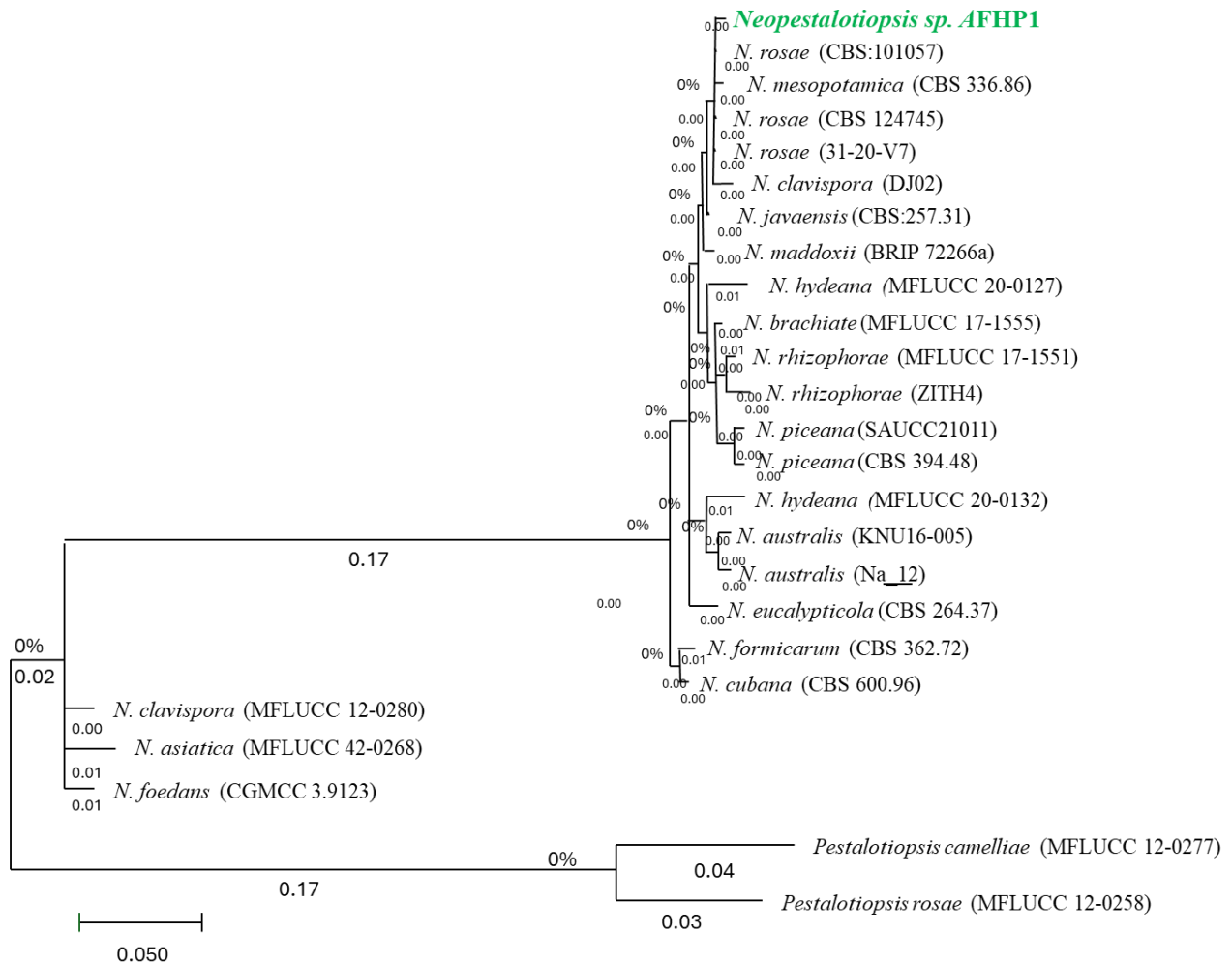


Figura 8. Árbol filogenético generado mediante el método de Inferencia Bayesiana con 1 millón de generaciones, la desviación estándar final fue 0,002516. El patrón de sustitución de nucleótidos para ITS fue GTR + G, para TEF1 fue GTR + I + G y para B-Tub fue GTR + I + G.

Se realizó un segundo árbol filogenético con inferencia Bayesiana, pero esta vez quitando algunas secuencias repetidas. El resultado fue diferente, esta vez el hongo AFHP1 se agrupó en el clado de *Neopestalotiopsis maddoxii* (figura 9). *N. rosae* y *N. maddoxii* son muy cercanas y morfológicamente indistinguibles. La secuencia de los genes ITS, TUB y TEF de estas dos especies tiene un alto porcentaje de similitud, 99.07%, 99.53% y 99.37%, respectivamente (Prasannath *et al.*, 2021). Para poder identificar la especie del hongo AFHP1 con mayor certeza sería necesario secuenciar el genoma completo o quizá realizar un nuevo análisis filogenético en el que se incluyan más secuencias de *N. maddoxii*. Por otro lado, se recalca que el hongo *N. maddoxii* ha sido asociado

con la enfermedad "the dry flower" de la planta de macadamia y no con la planta de la fresa (Prasannath *et al.*, 2021).

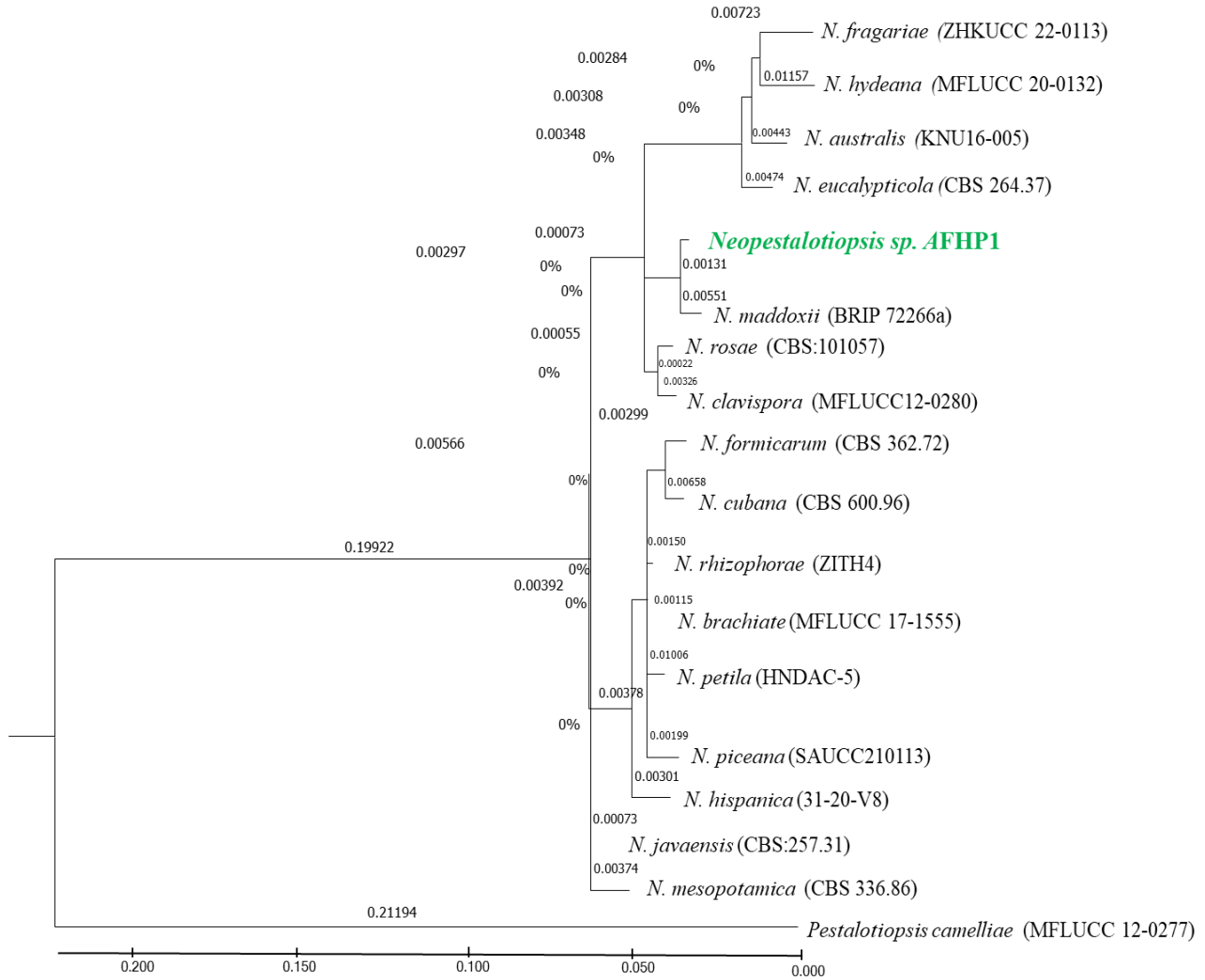


Figura 9. Segundo árbol filogenético generado mediante el método de Inferencia Bayesiana con 1 millón de generaciones, la desviación estándar final fue 0,002516. El patrón de sustitución de nucleótidos para ITS fue GTR + G, para TEF1 fue GTR + I + G y para B-Tub fue GTR + I + G.

Con el fin de corroborar que el hongo identificado como *Neopestalotiopsis sp. AFHP1* era el agente causal de la enfermedad “Pestalotia”, en mayo de 2023 se ensayaron los postulados de Koch. Por ello se infectaron plantas de fresa var. Mignonette mediante dos métodos; el primero haciendo punción en la corona e inoculando 1 mL de la solución de esporas a  $1-1.5 \times 10^6$  esp/mL en la base de la corona y raíz y la segunda asperjando el mismo volumen y la misma concentración al follaje.

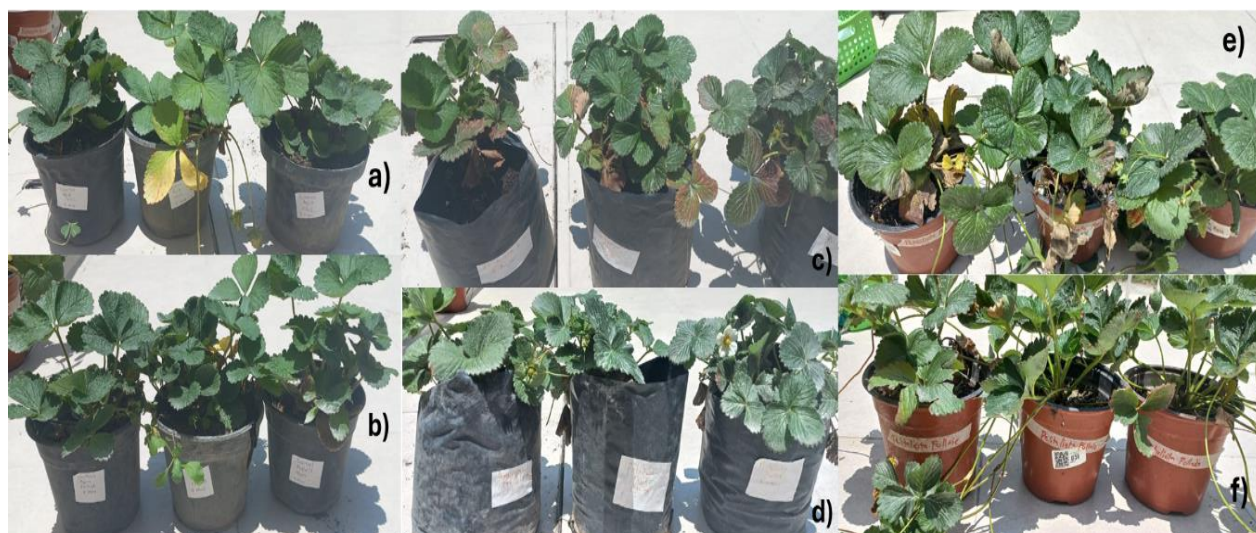


Figura 10. Infección de las plantas de fresa con el hongo *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 para la evaluación de los postulados de Koch. En la parte superior están las plantas inoculadas a la raíz; a) Control, c) Planta pequeña, e) Planta grande. En la parte inferior las plantas inoculadas al follaje; b) Control, d) Planta pequeña, f) Planta grande.

Los resultados obtenidos revelaron que aquellas plantas que fueron inoculadas en la base de la corona y raíz mostraron más síntomas de la enfermedad en comparación con aquellas que fueron inoculadas en el follaje; observando los siguientes síntomas: coloración morada-cobrizo, manchas foliares y marchitamiento de las hojas desde su margen hacia el centro (figura 10). Estos resultados muestran que el hongo *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 aislado de plantas con la enfermedad *Pestalotia* puede generar los mismos síntomas de donde se aisló, confirmando así el tercer postulado de Koch; el cual menciona que “el organismo aislado y puro e inoculado en un huésped sano debería poder causar la enfermedad” (Volvy, 2008). Resultados similares los obtuvo Vallejo en 2021; quien concluyó que la inoculación por punción o inyección de las esporas de *Neopestalotiopsis* en la corona, es la forma más eficaz para la infección; lo cual puede ser atribuido a que el hongo es capaz de colonizar más rápidamente el tejido debido a la generación de heridas o aberturas naturales en las plantas (Van Hemelrijck *et al.*, 2017; Rebollar-Alviter *et al.*, 2020).

Tres meses después de la primera inoculación se inspeccionó la corona, la cual mostró una coloración marrón rojiza indicando su pudrición (figura 11).

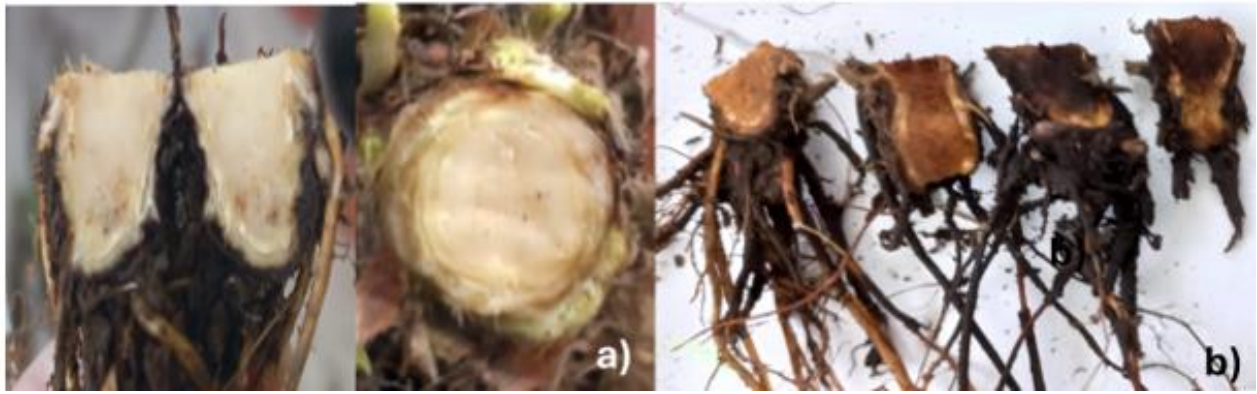


Figura 11. Pudrición en la corona. a) Coronas del tratamiento control, b) coronas de plantas que fueron inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 en la base de la corona.

Los síntomas observados en el experimento también han sido reportados por Chandana *et al.* 2024; Acosta, 2022; Rebollar *et al.* 2020; Martínez, 2020; donde además de la sintomatología foliar muestran el daño causado en la corona por cepas de *Neopestalotiopsis rosae*, observándose también esa coloración marrón-rojiza al cortar la corona. También especies del género *Pestalotiopsis* son capaces de causar pudrición de la corona de plantas de fresa según lo reportado por Van Hemelrijck, 2017.

Un segundo experimento de infección de plantas de fresa var. Mignonette se llevó a cabo en mayo de 2024, el cual se concluyó al mes y medio después de la inoculación. A partir de los 25 días después de la primera inoculación comenzaron a aparecer síntomas foliares parecidos a los observados en el primer experimento. Sin embargo, la pudrición no fue tan severa ya que la coloración marrón no se observó en toda la corona. Posteriormente se logró reaislar al hongo *Neopestalotiopsis* sp. el cual mantuvo las mismas características macro y microscópicas que el inóculo AFHP1 (figura 12), sugiriendo que este era capaz de generar la enfermedad “Pestalotia” causando la pudrición de la corona de las plantas y manchas foliares.

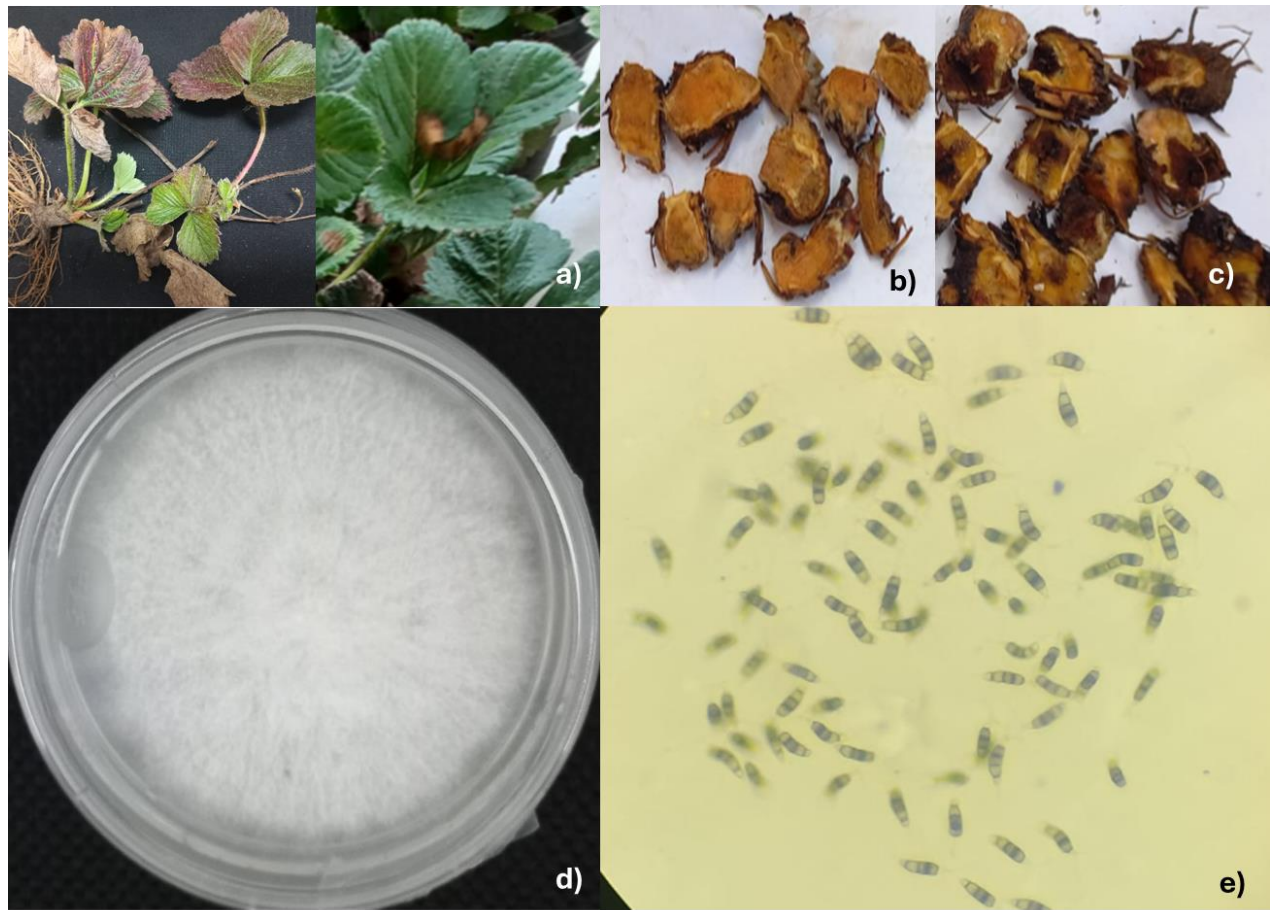


Figura 12. Reaislamiento de *Neopestalotiopsis rosae*. a) Coloración morada-rojiza, b y c) coronas de plantas que fueron tratadas con *Neopestalotiopsis rosae* (a) tratamiento con agua y c) tratamiento con *Neopestalotiopsis rosae*), d) Hongo reaislado con características macroscópicas antes vistas y e) Conidios con características microscópicas antes vistas.

Para confirmar que el hongo reaislado era *Neopestalotiopsis* sp. se obtuvo la secuencia de la región ITS de este hongo y se hizo un análisis filogenético el cual permitió inferir que la identidad del hongo era nuevamente *Neopestalotiopsis* (figura 13).

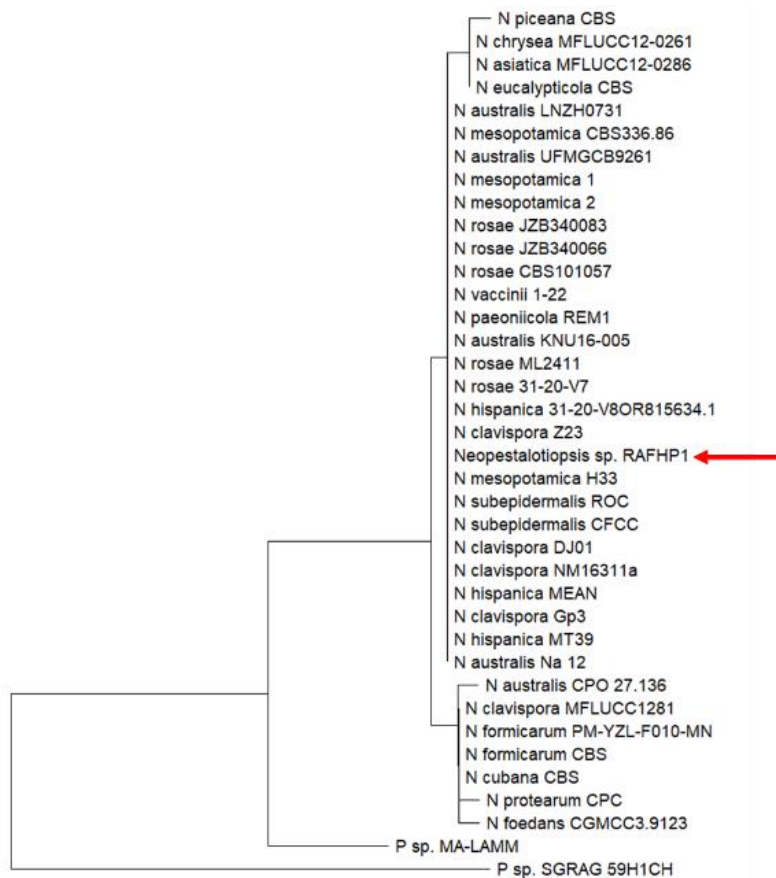


Figura 13. Árbol filogenético para el hongo reaislado basado en secuencias ITS de especies de *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis*. Modelo de mínima evolución elaborado en MEGA 11.

Para proponer agentes de biocontrol contra *Neopestalotiopsis sp.* AFHP1 se aislaron organismos endófitos de diferentes tejidos de la fresa (raíz, tallo, hoja y fruto), los cuales en condiciones de cultivo exhibían diferentes características morfológicas y microscópicas. Se aislaron un total de 36 organismos, de los cuales 33 fueron bacterias y 3 hongos. El tejido que más aislados tuvo fue la raíz con 15 aislados (13 bacterias y 2 hongos) representando el 42% del total. Del tallo se aislaron 10 siendo el 28% el total seguido del fruto con 7 (19%) y de la hoja 4 (11%). Las 13 bacterias aisladas de la raíz fueron bacilos Gram negativos y en los otros tres tejidos se encontraron bacilos Gram positivos (figura 14).

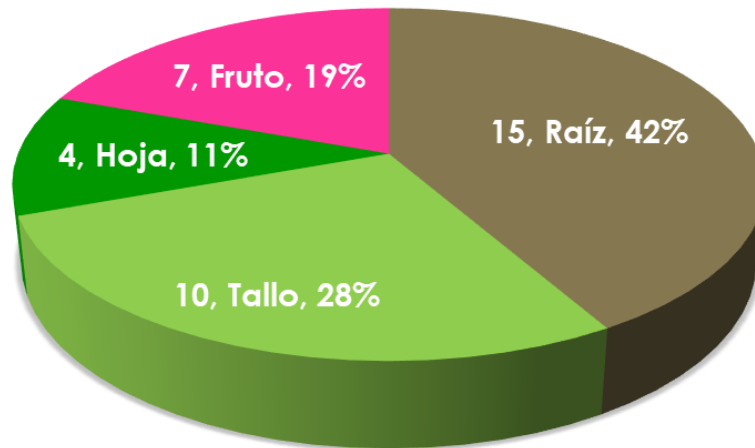


Figura 14. Porcentaje de organismos endófitos en los diferentes tejidos de la fresa, de un total de 36 aislados.

Con cada uno de los 36 aislados purificados se realizaron pruebas de antagonismo mediante cultivo dual. Se determinó el porcentaje de inhibición de los 36 aislados contra *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1. Los resultados mostraron que solo 16 aislados inhibieron el 50% o más el crecimiento de *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1, de los cuales 10 fueron bacilos Gram positivos y seis Gram negativos. De los cuales seis fueron de tallo y raíz, tres de la fruta y uno de la raíz (figura 15). Los aislados ATB5, ATB6, ATB10 y AFBCC fueron los que antagonizaron en mayor porcentaje a *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1. Las pruebas de antagonismo llevadas a cabo con los hongos endófitos aislados no mostraron un efecto de inhibición esperado.

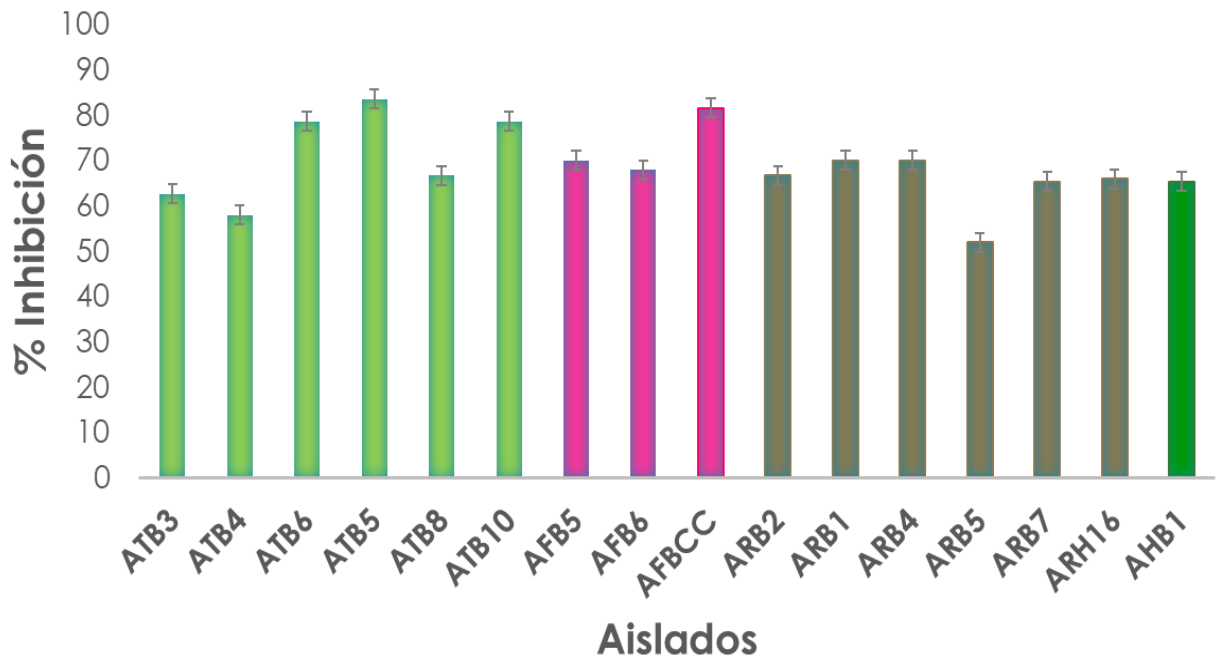


Figura 15. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis* sp. AHFP1 por bacterias aisladas de plantas de fresa. Las barras de color verde representan a los organismos aislados del tallo, las de color rosa a las de fruto, las cafés a las de la raíz y el verde bandera de la hoja.

Para proceder con las pruebas de control biológico *in planta* se seleccionó el aislado AFBCC, el cual, siendo procedente del tejido de la fruta, pudo ser cultivado en PDA y mostró un porcentaje de inhibición del crecimiento del 82% de *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 y además presentaba características del género *Bacillus* (figura 16). Cabe mencionar que el aislado ATB5 muestra un porcentaje de inhibición un tanto mayor que el AFBCC, por lo que podría haber sido elegido para las pruebas de biocontrol *in planta*. Sin embargo, al ser AFBCC uno de los primeros organismos purificados, por mostrar un buen porcentaje de inhibición *in vitro* y por estar familiarizados con sus características morfológicas se procedió a emplearlo para las siguientes fases del experimento.

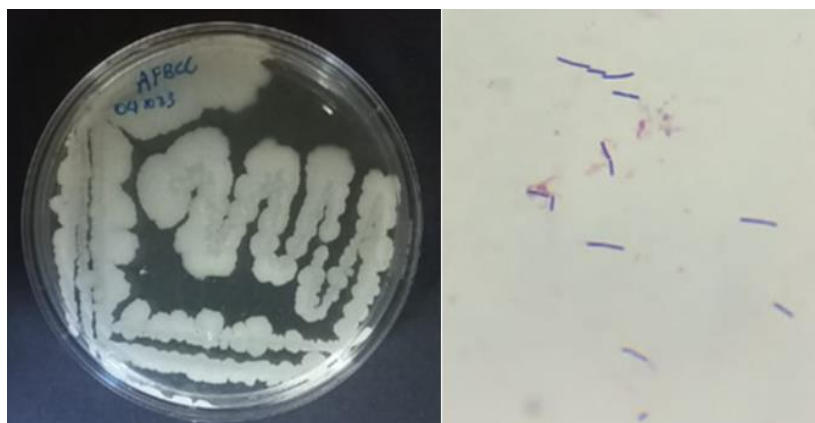


Figura 16. Características morfológicas y microscópicas del aislado AFBCC, similares a las del género *Bacillus*.

Para tener una aproximación de la especie de *Bacillus* a la que pertenece el aislado AFBCC se obtuvo una secuencia de 1335 nucleótidos de la región del gen RNA ribosomal 16S y con la cual se hizo un análisis filogenético usando el modelo de mínima evolución incluyendo 56 secuencias de diferentes especies de *Bacillus* obtenidas del GenBank del NCBI; este análisis reveló que el aislado AFBCC se agrupa con un valor de Bootstrap de 85% en un clado con *B. subtilis*, *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis*, sugiriendo que el aislado AFBCC podría ser de alguna de estas especies (figura 17).

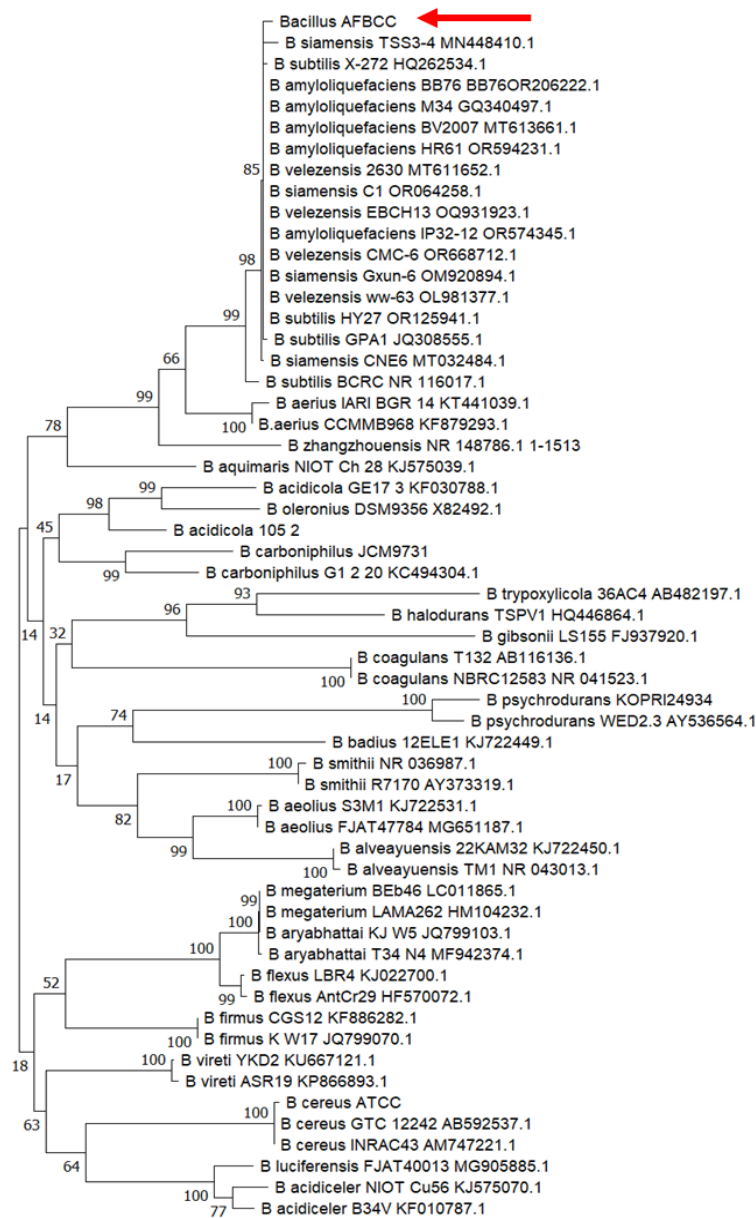


Figura 17. Árbol filogenético basado en secuencias 16 S de especies de *Bacillus*. Modelo de mínima evolución elaborado en MEGA 11 con valores de Bootstrap de 2000 repeticiones.

Una vez que se caracterizó al aislado AFBCC como especie del género *Bacillus* se volvió a evaluar su actividad antagónica *in vitro* mediante cultivo dual por triplicado. El resultado de dicho ensayo corroboró la inhibición del hongo en presencia del *Bacillus* sp. AFBCC mientras que en ausencia del aislado bacteriano (control), no se observó tal efecto (figura 18).

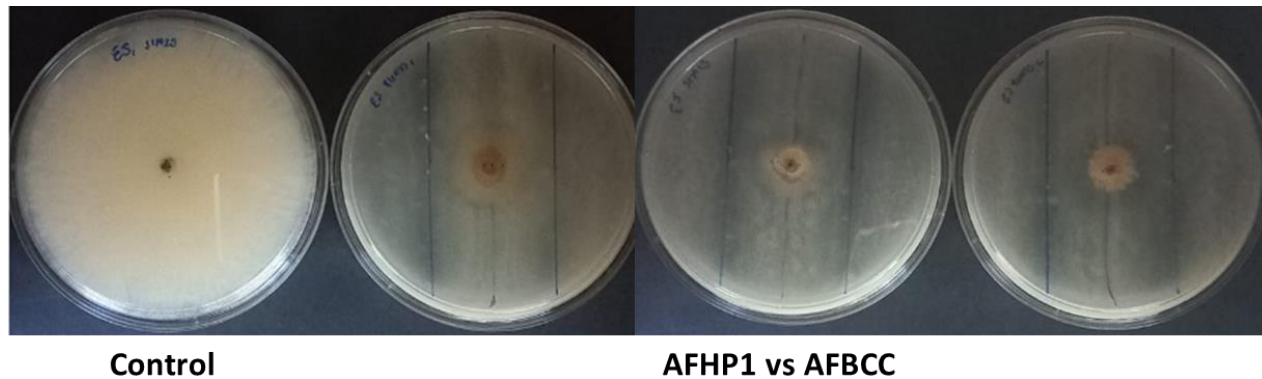


Figura 18. Cultivo dual para evaluar la capacidad antagonista del *Bacillus* sp. AFBCC contra *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 en medio PDA.

El control biológico del género *Bacillus* se da principalmente por la producción de metabolitos antimicrobianos y lisis enzimática, los cuales provocan la formación poros en pared y membrana celular de los microorganismos fitopatógenos, inhibiendo su crecimiento o actuando de forma indirecta al inducir respuestas en la defensa de las plantas. Ariza y Sánchez (2012) mencionan que algunos de los principales metabolitos producidos por *Bacillus* son la surfactina, fengicina, iturina y bacilomicinas. Otros compuestos que se han estudiado y que participan en el biocontrol son fenazinas, lipopéptidos cíclicos, enzimas líticas y producción de sideróforos (Villareal et al. 2018; Morales et al. 2019; Miguel et al. 2024).

Una vez confirmado el efecto antagónico *in vitro* del *Bacillus* sp. AFBCC contra *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1, se evaluó en dos ensayos independientes su efecto *in planta*. Después de tres meses de la primera inoculación con el *Bacillus* sp. AFBCC y su interacción con *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1, se dio por terminado el primer experimento *in planta* y los resultados se muestran en la figura 19.

En principio, se observó que las plantas inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 en la raíz o en la base de la corona (NR) estaban más afectadas que aquellas inoculadas al follaje (NF). Esto al notarse una marchitez generalizada y coloración características de la enfermedad e incluso la

presencia de plantas muertas; indicando así que la severidad de la enfermedad se presentó más grave cuando se inoculó el hongo en la raíz; estos resultados fueron semejantes a los vistos en los postulados de Koch.

Cuando el *Bacillus* sp. AFBCC fue inoculado al follaje (BF) y el hongo inoculado a la raíz (BF+NR) la interacción de ambos propició marchitez, pero no tan severa que cuando el hongo se inoculo solo. Por otro lado, si la interacción de ambos es en el follaje (BF+NF) pareciera que la presencia del *Bacillus* sp. AFBCC propició que no hubiera un efecto negativo por parte del hongo, esto debido a que no se observó marchitez en las plantas; pero aun así no se notaba que las plantas estuvieran completamente enfermas, pudiendo notarse un aspecto prometedor del aislado AFBCC como agente de biocontrol.

Lo más revelador fue cuando el *Bacillus* sp. AFBCC fue inoculado a la raíz (BR), aún con la presencia de *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 inoculado en la raíz (BR+NR) observándose que las plantas no mostraban marchitez en comparación que cuando el hongo se inoculó solo. Y además cuando el hongo se inoculó al follaje (BR+NF), pareció que el hongo no fue capaz de generar un efecto negativo al no enfermar a las plantas; observándose así mejor el efecto de biocontrol por parte del *Bacillus* sp. AFBCC cuando es inoculado a la raíz, independientemente de la manera en que es inoculado el hongo fitopatógeno. Esto puede deberse a que el *Bacillus* sp. AFBCC al estar presente en el suelo o sustrato puede producir una mayor cantidad de metabolitos que inhiben el crecimiento del fitopatógeno o podría ayudar a inducir una respuesta sistémica en la planta para su protección, además de interaccionar de manera beneficiosa con otros microorganismos presentes en el mismo, que pueden proteger a las plantas.

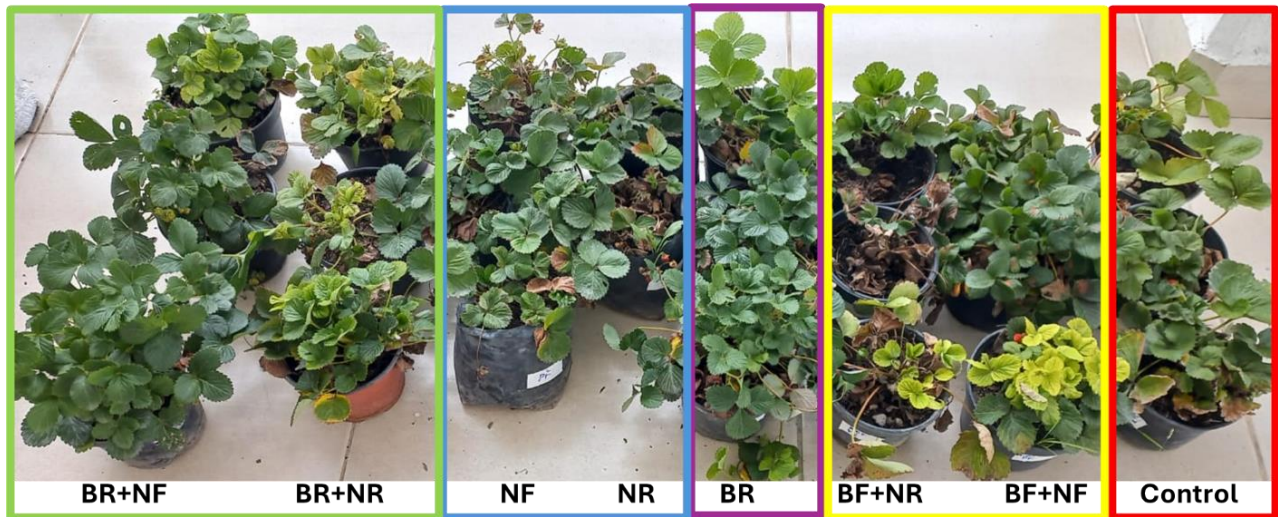


Figura 19. Evaluación “in planta” de la actividad de biocontrol del *Bacillus* sp. AFBCC contra *Neopestalotiopsis rosae* AFHP1 en plantas de fresa. Rectángulo de color verde indica el tratamiento de *Bacillus* sp. AFBCC inoculado a la raíz (BR) y el hongo *N. rosae* AFHP1 al follaje (NF) y raíz (NR), el rectángulo color azul muestra el tratamiento de *N. rosae* AFHP1 a la raíz (NR) y al follaje (NF), el rectángulo morado revela el tratamiento de *Bacillus* sp. AFBCC inoculado a la raíz (BR), el amarillo muestra a *Bacillus* sp. AFBCC inoculado al follaje (BF) y el hongo *N. rosae* AFHP1 inoculado a la raíz (NR) y al follaje (NF) y el rectángulo rojo indica las plantas control, tratadas solo con agua.

Para verificar el éxito del biocontrol se realizó una inspección a nivel de la corona, lo cual mostró el efecto de *Bacillus* sp. AFBCC contra *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 en las plantas de fresa, en las que se apreció un menor daño en la corona (indicado por una coloración marrón-rojiza) que cuando las plantas se inocularon solo con el hongo en ambos experimentos (figura 20).

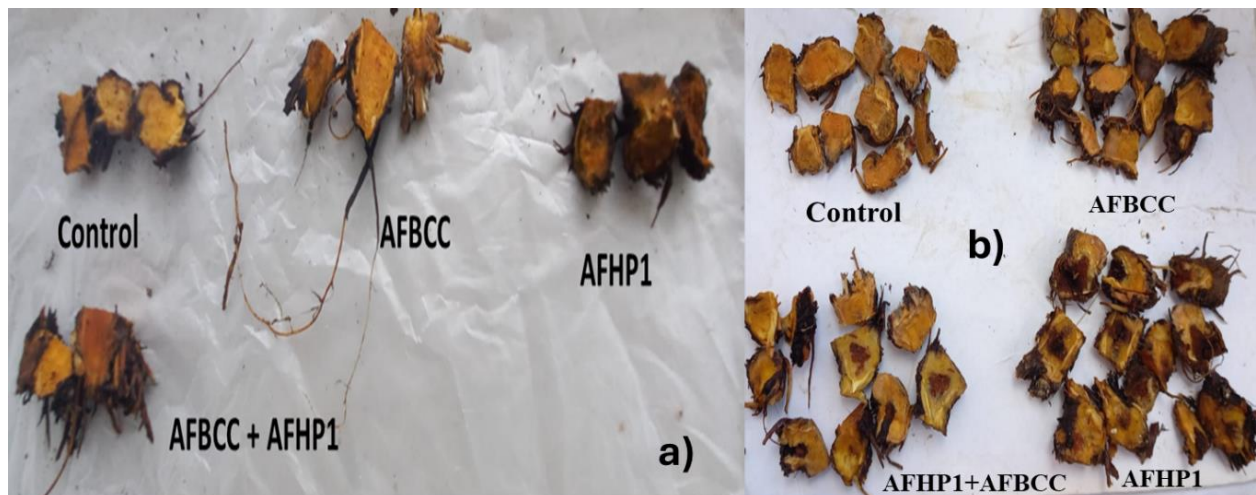


Figura 20. Efecto de biocontrol ejercido por el *Bacillus* sp. AFBCC contra *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 a nivel de corona. a) Primer experimento, b) Segundo experimento. Las acotaciones muestran: Control.- plantas tratadas con agua, AFBCC.- plantas tratadas con el *Bacillus* sp, AFHP1.- plantas tratadas con el hongo *Neopestalotiopsis* sp., y AFBCC+AFHP1.- interacción de bacteria-hongo.

El efecto de control biológico visto pudo haber sido por algunos metabolitos generados por el *Bacillus* sp. AFBCC, tales como antifúngicos, antimicrobianos, enzimas líticas, producción de sideróforos, entre otros. Diversos estudios han evidenciado el papel de agentes de biocontrol de distintas especies del género *Bacillus*; por ejemplo, Mairesse *et al.* (2018), investigaron el efecto de *Bacillus subtilis* contra *Colletrotrichum* sp. y *Pestalotiopsis* sp. causantes de la antracnosis y mancha marrón en plantas de fresa; concluyendo que en las plantas que fueron tratadas con el *B. subtilis* la incidencia de las enfermedades fue menos severa.

Saldaña (2021) mostró que el porcentaje de enfermedades fúngicas en plantas de fresa disminuyó al ser tratadas con *Bacillus subtilis* y *Trichoderma kiningiopsis*. En otro trabajo se estudió el efecto de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium solani* causante de la podredumbre de la raíz en plántulas de fresa y se concluyó que la aplicación de este *Bacillus* en plántulas de fresa infectadas con el hongo disminuye la severidad de la enfermedad en comparación con aquellas que solo se infectaron con el hongo (Yang *et al.*, 2024).

También se determinó si el aislado bacteriano AFBCC además de tener actividad de biocontrol podría ser una bacteria de promoción del crecimiento vegetal, pues se observó que aquellas plantas inoculadas con el aislado mostraban un mayor volumen foliar (figura 19, rectángulo morado). Por ello, se evaluó la altura y el peso fresco de las plántulas. El peso fresco de aquellas plantas tratadas con *Bacillus* sp. AFBCC mostraban diferencia significativa, aunque en el tamaño de las plantas existía una diferencia, esta no fue significativa (figura 21).

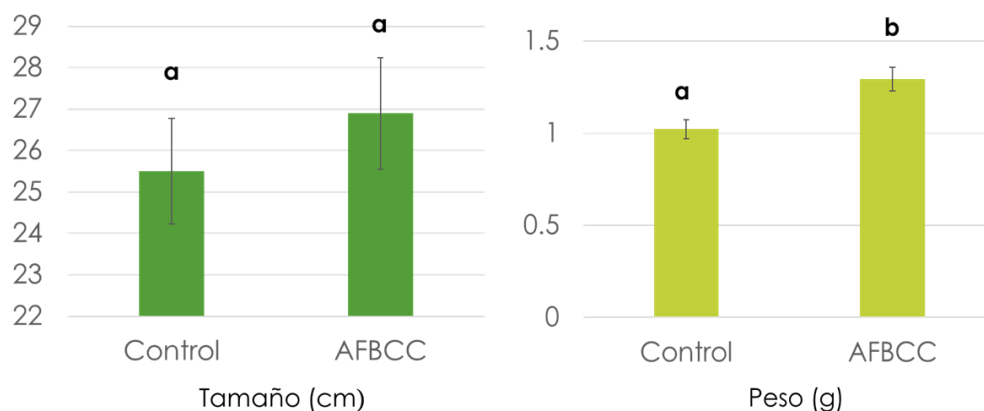


Figura 21. Efecto promotor del crecimiento por el *Bacillus* sp. AFBCC en la altura y el peso fresco de plantas de fresa de 6 semanas de edad tratadas con el aislado. Las medias se compararon mediante una prueba t-student, con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

Además, se evaluaron dos características más de promoción de crecimiento vegetal, la producción de ácido indolacético y la solubilización de fosfatos. Para ello se cuantificó la producción de indoles totales a las 48 h de cultivo, la cual fue de  $105.26 \mu\text{g/mL} \pm 15.12$ . Estos resultados son similares a los obtenidos por Sonali *et al.* (2018) quienes determinaron que *B. subtilis* DR2 produjo  $137.33 \mu\text{g/mL}$  de ácido indolacético, aunque ellos emplearon un medio libre de N<sub>2</sub> (JNFb). En otro trabajo, la cepa Mt3b de *B. subtilis* generó  $36.6 \mu\text{g/mL}$  usando medio LB y triptófano como precursor (Wagi y Ahmed, 2019). Esto quiere decir que *Bacillus* sp. AFBCC puede generar casi el triple de lo que genera la cepa Mt3b, usando el mismo medio de crecimiento. Cuando una bacteria produce indoles, estos tienen un efecto fitoestimulante que mejorará el crecimiento de la planta al desarrollar e incrementar el área superficial de las raíces; facilitando así la toma de nutrientes (Ahmed y Hasnain, 2010). La producción de indoles dependerá de varios factores como: condiciones del medio de cultivo, condiciones ambientales, la etapa del crecimiento, así como las especies y cepas que los produzcan (Suliasih y Widawati, 2020).

Finalmente se evaluó si el *Bacillus* sp. AFBCC podía solubilizar fosfato ya que es otra cualidad importante de las bacterias de promoción del crecimiento vegetal.

En medio Pikovskaya y en medio NBRIP se evaluó la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico (fosfato insoluble, los componentes de estos medios se pueden observar en el anexo), en el primer medio la solubilización de fosfatos se confirma por la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia (Pikovskaya, 1948). El medio NBRIP tiene casi la misma composición que el medio Pikovskaya, pero contiene un indicador de pH (azul de bromotimol), que al acidificarse cambia de color de verde a amarillo y además de la a aparición del halo transparente, el cambio de coloración puede ser indicativo de solubilización (Mohamed *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020).

Se observó que *Bacillus* sp. AFBCC era capaz de crecer en los medios Pikovskaya y NBRIP. Sin embargo, no fue capaz de generar un halo transparente o claro alrededor de la colonia. También, aunque logró cambiar la tonalidad del medio a color amarillo, no fue tan evidente como lo hizo la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Pseudomonas putida* KT2240, cepas que han sido probados como solubilizadoras de fosfato (Molina, 2017), y que se usaron como controles positivos (figura 22).

En 1996, Nahas encontró una correlación entre el pH y el fósforo soluble. Diversos microorganismos como *Gluconacetobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, entre otros, son capaces de solubilizar fosfatos han sido capaces de transformar los sulfatos insolubles a solubles por medio de procesos de acidificación y quelación. Es aceptable que un pH bajo en el suelo puede aumentar la solubilización de fósforo (Goldstein, 1995; Wang et al. 2020).

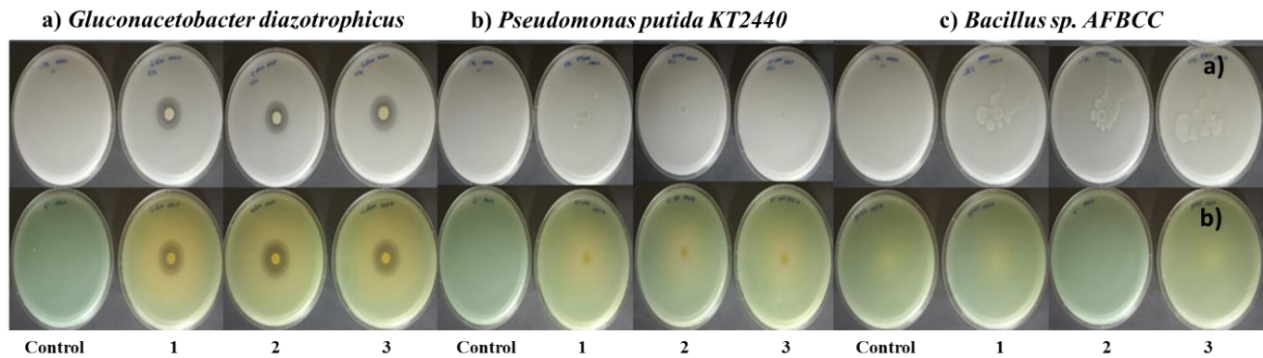


Figura 22. Solubilización de fósforo en medios Pikovskaya (a) y NBRIP (b).

*Bacillus* sp. AFBCC no mostró la formación del halo transparente característico de la solubilización de fosfatos. Sin embargo, logró alterar ligeramente la tonalidad del medio, lo que sugiere la producción de ácidos orgánicos. Esto podría indicar que, bajo diferentes condiciones experimentales, la solubilización de fósforo podría ser más evidente. Se ha documentado que especies del género *Bacillus* son capaces de producir diversos ácidos orgánicos, como ácido glucónico, láctico, succínico y acético, entre otros (Rajankar *et al.* 2007; Tejera *et al.* 2013; Saeid *et al.* 2018).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que se aisló al agente causal de la “Pestaliota” a partir de plantas de fresa enfermas provenientes del Estado de Guanajuato, siendo este un hongo del género *Neopestalotiopsis* y pudiendo pertenecer a las especies *N. maddoxii*, *N. javensis*, *N. mesopotámica* o *N. rosae*; verificando su efecto mediante los postulados de Koch.

También se determinó que la severidad de la enfermedad se observa más cuando el hongo *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 es inoculado a la raíz o en la base de la corona, demostrando que este hongo sí está asociado a la pudrición de la raíz y la corona en las plantas de fresa.

Por otro lado, se logró aislar el *Bacillus* sp. AFBCC a partir del fruto de la fresa, el cual es capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de *Neopestalotiopsis* sp. AFHP1 en casi un 95%. Además de mostrar un efecto protector *in planta* cuando es inoculado en la base de la corona, pues se observó que el daño o pudrición en la corona es menos severa en presencia del *Bacillus* sp. AFBCC. Además, se sugiere que podría tener un efecto de promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, es necesario hacer más pruebas que lo confirmen.

# Bibliografía

- Acosta, U. (2022). *Caracterización de aislamientos de Neopestalotiopsis spp. y efecto de fungicidas en pre y post-infección en el cultivo de fresa*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo.
- Ahmed, A., & Hasnain, S. (2010). Auxin-producing Bacillus sp.: auxin quantification and effect on the growth of Solanum tuberosum. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 313-319.
- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Hernández, E., Gayosso, E., Valenzuela, N., & Cureño, H. (2019). Antagonismo de Trichoderma spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259-1272.
- Angelopoulou, D. J., Naska, E. J., Paplomatas, E. J., & Tjamos, S. E. (2014). Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: Influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defence mechanisms and rhizosphere populations of BCAs. *Plant Pathol.*, 63, 1062-1069.
- Araujo, L., Moretti, F., Lage de Andrade, C., Mituti, T., Ramos, B., Larissa, B., & Duarte, V. (2023). Pestalotiopsis trachycarpicola causes leaf spot disease on blueberry in Santa Catarina, Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 18(14), 1-5. doi:10.007/s133114-023-00500-7
- Arrojave, J., Mosquera, S., & Villegas, V. (2017). Biocontrol activity of Bacillus subtilis EA-CB0015 cells and lipopeptides against postharvest fungal pathogens. *Biological Control*, 114(7), 195-200. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.08.014
- Bhagariya, D., & Prajapati, V. (2019). First Report of Pestalotiopsis clavispora (G.F.Atk.) Steyaert Causing Crown Rot Disease on Strawberry in India. *International Journal of Economic Plants*, 6(3), 140-142. doi:10.23910/IJEP/2019..6.3.0325
- Carvalho, D., Oliveira, R., Maeques, M., Milan, M., Pinho, D., & Dianese, É. (2019). Molecular, morphophysiological and pathogenic characterization of eucalypt Pestalotiopsis grandis-urophylla isolates, a new species. *Tropical Plant Pathology*, 44(132), 132-139. doi:10.1007/s40858-019-00277-0
- Celia, A. (2004). *El cultivo de la fresa para el ciclo otoño-invierno, en California, Estados Unidos de Norte América*.
- Chandana, R., Tharana, T., Chethan, D., Karan, R., Kruthika, R., Khan, F., . . . Palana, K. (2024). Neopestalotiopsis rosae, a novel pathogen causing leaf blight and crown rot of strawberry in India. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 133. doi:10.1016/j.pmpp.2024.102377
- Compant, S., Cambon, M., Vacher, C., Mitter, B., Samad, A., & Sessitsch, A. (2021). The plant endosphere world-bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*, 23(4), 1812-1829. doi:10.1111/1462-2920.15240
- Contreras, C., Silva, L., Gallegos, V., Ortiz, L., & Jofre, A. (2014). Incidencia de Infecciones Virales Mezcladas en un Área de Producción de Fresa en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(1), 12-25.
- Daengsuwan, W., Wonglom, P., Arikrit, S., & Sunpapao, A. (November de 2021). Morphological and molecular identification of Neopestalotiopsis clavispora causing flower blight on Anthurium andraeanum in Thailand. *Horticultural Plant Journal*, 6(6), 573-578.

- Doin de Moura, G. V., Machado, F., Martins, A., Marcela da Silva, C., Cuadrado, L., Forim, M., . . . Doria, J. (2021). Endophytic bacteria from strawberry plants control gray mold in fruits via production of antifungal compounds against *Botrytis cinerea* L. *Microbiological Research*, 251, 1-15. doi:10.1016/j.micres.2021.126793
- Ellis, M. (2008). *Verticillium wilt of Strawberry*. Ohio State University Extension .
- Espinoza, J., Briceno, E., Keith, L., & Latorre, B. (2008). Canker and Twig Dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, 92, 1407-1414.
- Essa, T., Kamel, S., Ismail, A., & El-Ganainy, S. (2018). Characterization and Chemical Control of *Neopestalotiopsis rosae* the Causal Agent of Strawberry Root and Crown Rot in Egypt. *Phytopathology*, 46(1), 1-19.
- Fan, J., Qiu, H., Long, H., Zhao, W., Xiang, X., & Hu, A. (2021). First report of leaf spot on sorghum caused by *Pestalotiopsis trachycarpicola* in China. *Journal of Plant Pathology*, 103, 1043-1044. doi:10.1007/s42161-021-00853-x
- Fernández-Ozuna, Y., Gini Álvarez, A., Lopez-Nicora, H., Arrúa Alvarenga, A., & Colmán, A. (2023). First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf spot and crown on strawberry (*Fragaria x ananassa*) in Paraguay. *New Disease Reports*(10.1002/ndr2.12239), 1-3.
- Gerardo-Lugo, S., Tovar-Pedraza, J., Maharchchikumbura, S., Apodaca-Sánchez, M., Correia, K., Saucedo-Acosta, C., . . . Beltrán-Peña, H. (2020). Characterization of *Neopestalotiopsis* Species Associated with Mando Grey Leaf Spot Disease in Sinaloa, México. *Pathogens*, 9(788), 1-17. doi:10.3390/pathogens9100788
- Goldstein, A. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biol. Agric. Hortic*, 12, 185-193.
- Gupta, S., & Saxena, S. (2023). Endophytes: Saviour of apples from post-harvest fungal pathogens. *Biological Control*, 182, 1-13. doi:10.1016/j.biocontrol.2023.105234.
- Hajek, A., & Eilenberg, J. (2018). *Natural Enemies An Introduction to Biological Control* (2nd ed.). UK: Cambridge University Press.
- Huanaluck, N., Jayawardena, R., Maharachchikumbura, S., & Harishchandra, D. (2021). Additions to pestalotioid fungi in Thailand: *Neopestalotiopsis hydeana* sp. nov and *Pestalotiopsis hydei* sp. nov. *Phytotaxa*, 479, 23-42.
- Huanluek, N., Jjayawardena, R., Maharachchikumbura, S., & Harishchandra, D. (2021). Additions to pestalotioid fungi in Thailand: *Neopestalotiopsis hydeana* sp. nov. and *Pestalotiopsis hydei* sp. nov. *Phytotaxa*, 479, 23-43.
- Intriago. (2021). Outbreaks of crown rot in *Fragaria x ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 7-9.
- ITSC. (2018). *Manual de Producción de fresa en Coacóman Michoacán*. Divulgación, Instituto Tecnológico Superior de Coacóman, Ingeniería en Desarrollo Comunitario, Michoacán.
- Jayawardena, R., Zhang, W., Liu, M., Maharachchikumbura, S., Zhou, Y., Huang, J., . . . Hyde, K. (2015). Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China. *Fungal Biology*, 119, 348-361.

- Jeewon, R. (2002). Phylogenetic relationships of Pestalotiopsis and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Mol. Phylogenet. Evol.*
- Jeewon, R. (2003). Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of Pestalotiopsis species. *Mol. Phylogenet. Evol.*
- Koike, S., Gordon, R., Oleg, D., Ajwa, H., Bolda, M., & Subbarao, K. (2013). Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by Fusarium and Macrophomina. *International Journal of Fruit Science*, 13, 76-83.
- Lahlali, R., Ezrari, S. R., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 1-33. doi:10.3390/microorganisms10030596
- Lahlali, R., Mchachti, O., Radouane, N., Ezrari, S., Belabess, Z., Khayi, S., . . . Ait Barka, E. (2020). The Potential of Novel Bacterial Isolates from Natural Soil for the Control of Brown Rot Disease (Monilinia fructigena) on Apple Fruits. *Agronomy*, 10(11), 1-19. doi:10.3390/agronomy10111814
- Landa, B., Hervas, A., Bethiol, W., & Jimenez-Diaz, R. (1997). Antagonistic activity of bacteria from chickpea rhizosphere against Fusarium oxysporum f. sp. ciceris. *Phytoparasitica*, 25, 305-318.
- Lawrence, D., Brittain, G., Aglave, B., & Sances, F. (2023). First Report of Neopestalotiopsis rosae Causing Crown and Root Rot of Strawberry in California. *Plant Disease*, 107(2), 566.
- Lira, R., & Ruiz, M. (2023). *Producción de Plantas de Fresa con Calidad Genética, Fisiológica y Fitosanitaria*. Divulgación tecnológica, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Centro, Uruapan.
- Liu, A.-R., Chen, S.-C., Wu, S.-Y., Xu, T., Guo, L.-D., Jeewon, R., & Wei, J.-G. (2010). Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in Pestalotiopsis taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 528-535.
- Lyoussfi, N., Lahlali, R., Letrib, C., Belabess, Z., Ouaabou, R., Ennahli, S., . . . Ait Barja, E. (2021). Improving the Biocontrol Potential of Bacterial Antagonists with Salicylic Acid against Brown Rot Disease and Impact on nectarine Fruits Quality. *Agronomy*, 11(2), 1-15. doi:10.3390/agronomy11020209
- Maas, J. (1998). Infectious Diseases. En J. Maas, *Compendium of Strawberry Diseases* (2nd ed., págs. 16-81). EUA: The American Phytopathological Society.
- Maharachchikumbura, S., Guo, L., Cai, L., Chukeatirote, E., Wu, W., Sun, X., & Hyde, K. (2012). A multi-locus backbone tree for Pestalotiopsis, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Divers*, 56, 95-129.
- Maharachchikumbura, S., Guo, L.-D., Chukeatirote, E., Bahkali, A., & Hyde, K. (2011). Pestalotiopsis-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50, 167-187.
- Maharachchikumbura, S., Hyde, K., Groenewald, J., Xu, J., & Crous, P. (2014). Pestalotiopsis revisited. *Studies in Mycology*, 121-186.
- Mairesse, C., Giuliana, G., Duarte, S., & Concepción, L. (2018). *Efecto del producto biológico a base de Bacillus subtilis sobre la antracnosis (Colletotrichum fragariae Brooks) y la mancha marrón (Pestalotiopsis sp.) en plantines de frutilla (Fragaria x ananassa Duch.)*. Universidad Nacional de

- Asunción, Facultad de Ciencias Agrarias, Área de Protección Vegetal. Argentina: Asociación de Universidades GRUPO MONTEVIDEO.
- Martin, R., & Tzanetakis, I. (2006). Characterization and Recent Advances in Detection os Strawberry Viruses. *Plant Disease*, 90(4), 384-396. doi:10.1094/PD-90-0384
- Martin, R., & Tzanetakis, I. (2012). Expanding Field of Strawberry Viruses Which Are Important in North America. *International Journal of Fruit Science*, 184-195.
- Martínez, M. (2020). *Fuente de inóculo primario y distribucipon regional de la intensidad de la marchitez y tizón de la hoja de la fresa en el Valle de Zamora, Michoacán*. Tesis de Maestría, Universidas Autónoma Chapingo, Parasitología Agrícola, Michoacán.
- Matos, K. (2023). *Guía de Cultivo Fresa*. Divulgación técnica, Dirección General de Riesgos Agropecuarios.
- Mei, C., Amaradasa, B. S., Chretien, R. L., Liu, D., Snead, G., Samtani, J. B., & Lowman, S. A. (2021). A Potential Application of Endophytic Bacteria in Strawberry Production. *Horticulturae*, 7, 1-11.
- Meszka, B., & Michalecka, M. (2016). Identification of Phytophthora spp. isolated from plants and soil samples on strawberry plantations in Poland. *Journal Plant Dis Prot*, 123, 29-36. doi:10.1007/s41348-016-0007-2
- Miguel, G., Alemán, M., Ramirez, G., & Navarro, D. (2024). Bacillus: Una bacteria versátil, multifuncional y ampliamente aplicada. *Salud*, 7(13).
- Miller, K., Feucht, W., & Schmid, M. (2019). Bioactive Compounds of Strawberry and Blueberry and Their Potencial Health Effects Based on Human Invertion Studies: A Brief Overview. *Nutrients*, 11(7), 1-12. doi:10.3390/nu11071510
- Mohamed, E., Farag, A., & Youssef, S. (2018). Phosphate Solubilization by Bacillus subtilis and Serratia marcescens Isolated from Tomato Plant Rhizosphere. *Journal of Enviromental Protection*, 9, 266-277.
- Morales, B., González, R., Vázquez, F., De La Mora, A., Quiñonez, M., Muñoz, J., & Valero, J. (2019). Importancia del Secretoma de Bacillus spp. en el control biológico de hongos fitopatógenos. *Alianzas y Tendencias-BUAP*, 4(15), 1-13.
- Moyolema, I. (2022). *Sensibilidad in vitro de Neopestalotiopsis spp. agente causal de la pudrición de la corona de frutilla a fungicidas de diferentes modos de acción*. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Riobamba.
- Muhammad, A., Qaiser, K., & Sessitsch, A. (2014). Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117, 232-242. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.078
- Norphanphoun, C., Jayawardena, R., Chen, Y., Wen, T., Meepol, W., & Hyde, K. (2019). Morphological and phylogenetic characterization of novel pestalotioid species associated with mangroves in Thailand. *Mycosphere*, 10, 531-578.
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australas. Plant Pathol.*, 46, 292--304..
- Pandey, A., Sinniah, G., Yadav, S., & Maharachchikumbura, S. (2023). Pestalotiopsis-like species: host network and lifestyle on tea crop. *Fungal Biology Reviews*. doi:10.1016/j.fbr.2023.100340

- Park, S., Lee, S., Lee, J., Back, C., Ten, L., Lee, H., & Jung, H. (2016). First report of *Neopestalotiopsis australis* isolated from soil in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 44(4), 360-364.
- Pastrana, A., Basallote, U., Aguado, A., Akdi, K., & Nieve, C. (2016). Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 55, 109-120.
- Patel, S., Sayyed, R., & Saraf, M. (2016). Bacterial Determinants and Plant Defense Induction: Their Role as Biocontrol Agents in Sustainable Agriculture. En K. Hakeem, M. Akhtar, & Springer (Ed.), *Plant, Soil and Microbes Volume 2: Mechanisms and Molecular Interactions* (págs. 187-204). Switzerland.
- Pérez-García, A., Romero, D., & De Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol*, 22, 187-193.
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of P in soil in connection with vital activity by some microbial species. *Microbiologica*, 17, 362-370.
- Prasannath, K., Shivas, R., Galea, V., & Akinsanmi, O. (2021). *Neopestalotiopsis* Species Associated with Flower Diseases of *Macadamia integrifolia* in Australia. *Journal of Fungi*, 7(771), 1-17. doi:10.3390/jof7090771
- Rajankar, P., Tambekar, D., & Wate, S. (2007). Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6), 701-703.
- Rebollar, A., Acosta, U., & Silva, H. (2024). Manejo Integrado del Tizón foliar y Pudrición de Corona de la Fresa causada por *Neopestalotiopsis rosae*. *ResearchGate*.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., & Parra-Robles, B. (2020). An Emerging Strawberry Fungal Disease Associated with Root Rot, Crown Rot and Leaf Spot Caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Disease*, 104, 2054-2059. doi:10.1094/PDIS-11-19-2493-SC
- SADER. (2024). *México se posiciona como país altamente productor y exportador de berries*. Guadalajara: Gobierno de México. Recuperado el 16 de Octubre de 2014, de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/mexico-se-posiciona-como-pais-altamente-productor-y-exportador-de-berries?idiom=es>
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska, J. (2018). Phosphorus Solubilization by *Bacillus* Species. *molecules*, 23, 1-18. doi:10.3390/molecules23112897
- SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. Ciudad de México: SAGARPA.
- Saldaña, J. (2021). *Control de hongos patógenos con Bacillus subtilis y Trichoderma koningiopsis en un cultivo de fresa en condiciones de campo*. Tesis de Maestría, IPN, CIIDIR, Michoacán.
- Sonali, C., Prabha, A., Singh, S., Kumari, S., & Kiran, S. (2018). Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production by Diazotrophic *B. subtilis* DR2 (KP455653), Isolated from Rhizosphere of *Eragrostis cynosuroides*. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 7(2), 1-8.
- Sousa, M., Tavares, R. G., & Lino-Neto, T. (2004). First report of *Hakea sericea* leaf infection caused by *Pestalotiopsis funerea* in Portugal. *Plant Pathology*, 53, 535.

- Subbagounder, M., Chinnusamy, K., Ashraf A., M., Nouf Mohammed, A.-E., Neveen, A.-R., & Essam Nageh, S. (2020). Antifungal activity of *Streptomyces* sp. SL03 against tea fungal plant pathogen *Pestalotiopsis theae*. *Journal Of King Saud University-Science*, 32, 3258-3264.
- Suliasih, & Widawati, S. (2020). *Isolation of Indole Acetic Acid (IAA) producing Bacillus siamensis from peat and optimization of the culture conditions for maximum IAA production*. Indonesian Institute of Sciences, Microbiology Division. Indonesia: IOP Publishing.
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., . . . Li, X. (2021). Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Protection*(147), 1-8.
- Tarazona, A. (2020). *Estudio de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la fresa (Fragaria x ananassa) y su relación con la composición de compuestos bioactivos*. Instituto de Ingeniería de Alimentos para el desarrollo, Universitat Politècnica de Valencia, Valencia.
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364.
- Vallejo, A. (2021). *Evaluación de la patogenicidad y agresividad de aislados de Neopestalotiopsis sp. y Fusarium sp. asociados a la pudrición de corona de frutilla (Fragaria ananassa DUCH.) en invernadero*. Tesis de Licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Ecuador.
- Van Hemelrijck, W., Ceusterman, A., Campenhout, J., Lieten, P., & Bylemans, D. (2017). Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. *Acta Horticulturae*, 781-786.
- Virrareal, M., Villa, E., Cira, L., & María, E. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 1-36.
- Volvy, C. (2008). Genesis and Evolution of Koch postulates and their relationship with phytopathology. A review. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.
- Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., . . . Verkley, G. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Microbiology*, 92, 135-154.
- Wagi, S., & Ahmed, A. (2019). *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ Life & Environment*, 1-14.
- Wang, D., Gabriel, M., Legard, D., & Sjulín, T. (2016). Characteristics of growing media mixes and application for open-field production of strawberry (*Fragaria ananassa*). *Scientia Horticulture*, 198, 294-303. doi:10.1016/j.scienta.2015.11.023
- Wang, J., Wei, H., Chang, R., Liu, H., & Wang, Y. (2017). First Report of Strawberry Bacterial Angular Leaf Spot Caused by *Xanthomonas fragariae* in Tianjin, China. *The American Phytopathological Society (APS)*, 1-13.
- Wang, Y., Li, P.-S., Zhang, B.-X., Wang, Y.-P., Meng, J., Gao, Y.-F., . . . Hu, X.-M. (2020). Identification of Phosphate-solubilizing Microorganisms and Determination of Their Phosphate-solubilizing Activity and Growth-promoting Capability. *Bioresources*, 15(2), 1560-2578.

- Watanabe, K., Parbery, D., Kobayashi, T., & Doi, Y. (2000). Conidial adhesion and germination of *Pestalotiopsis neglecta*. *Mycology Research*, 104(8), 962-968.
- Wilailuck, D., Wonglom, P., Arikrit, S., & Sunpapao, A. (2021). Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavispora* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. *Horticultural Plant Journal*, 7(6), 573-578. doi:10.1016/j.hpj.2020.10.004
- Yang, R., Liu, P., Ye, W., Chen, Y., Wei, D., Qiao, C., . . . Xiao, J. (2024). Biological Control of Root Rot of Strawberry by *Bacillus amyloliquefaciens* Strains CMS5 and CMR12. *Journal of Fungi*, 10(410), 1-19.
- Yedra, S. (2024). *Casi 50% de los municipios en Guanajuato son productores de fresa*. Guanajuato: TVcuatro noticias. Recuperado el 16 de 10 de 2024, de <https://tvcuatro.tv/noticias/casi-50-de-los-municipios-en-guanajuato-son-productores-de-fresa>
- Zhara, A., Jahanshir, A., Morahem, A., & Bahman, B. (2020). Isolation of strawberry endophytic bacteria and investigation of their antifungal effects on *Collectotrichum nymphaeae*, the causal agent of strawberry anthracnose. *Journal of BioControl in Plant Protection*, 8(1), 29-46. doi:10.22092/BCPP.2020.123653
- Wu, H., Tsai, C., Wu, Y., Ariyawansa, H., Chung, C., & Chung, P. (2021). First Report of *Neopestalotiopsis rosae* Causing Leaf Blight and Crown Rot on Strawberry in Taiwan. *Plant Disease*.

## Anexos

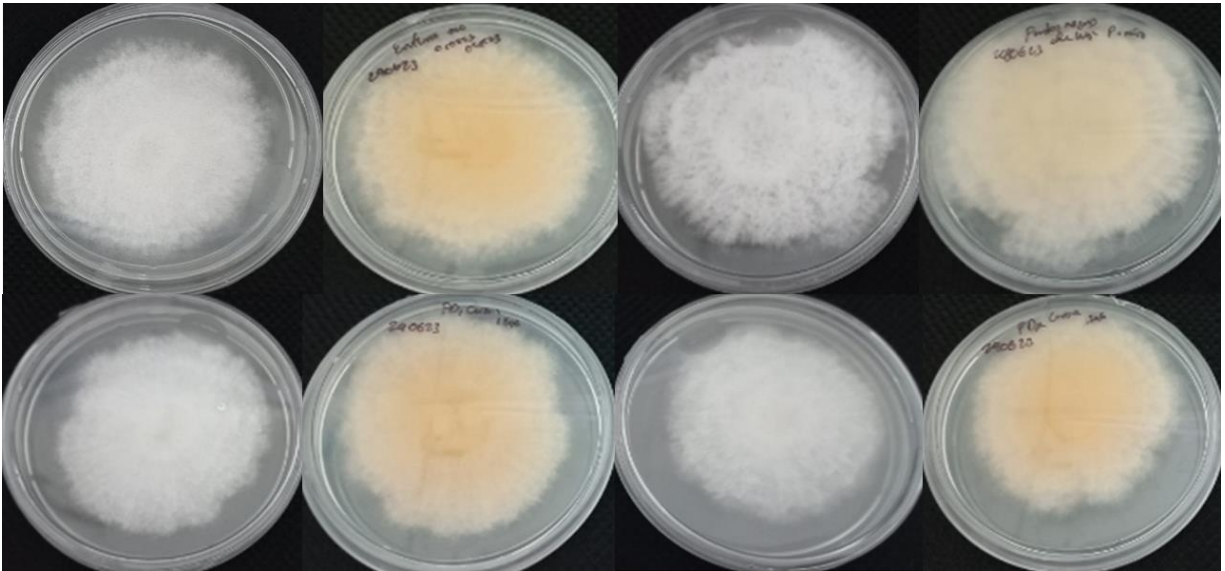


Figura 23. Otras cepas con la misma morfología que *Neopestalotiopsis* sp. aisladas de diferentes tejidos.

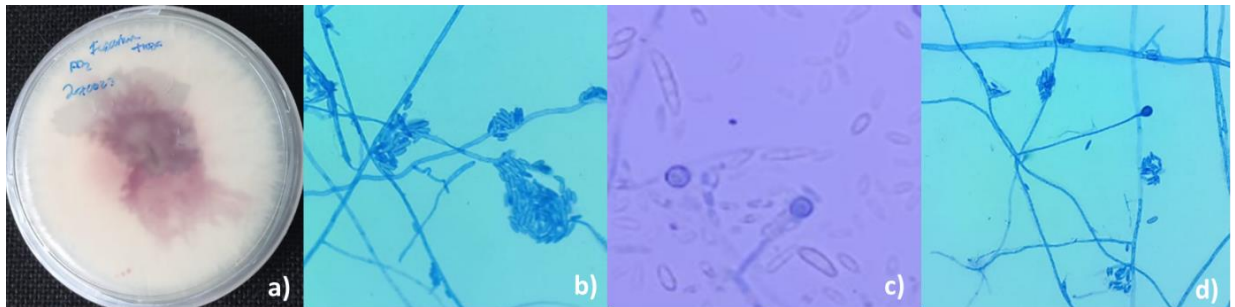


Figura 24. Hongo *Fusarium* sp. aislado de la raíz de la fresa. a) Características coloniales, b) Microconidios del género, c) Macroconidios y d) Clamidiosporas. Identificado mediante las tablas de Barnett & Hunter (1998).

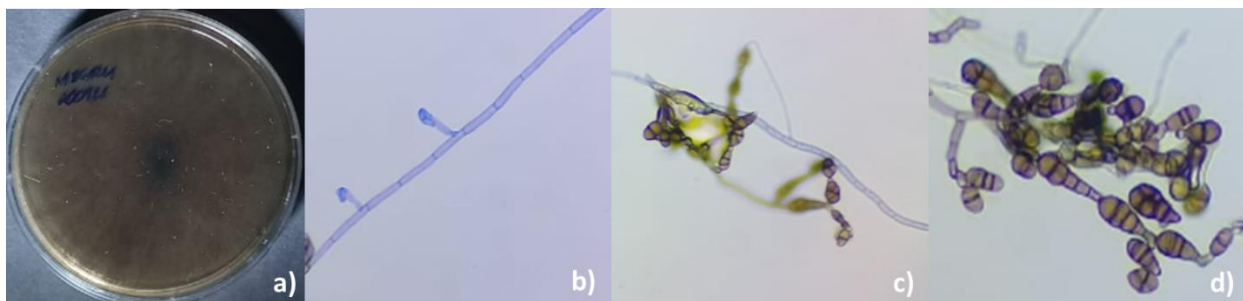


Figura 25. Hongo *Alternaria* sp. aislado de las hojas de la fresa. a) Características coloniales, b) Conidióforo simple. c y d) Conidios característicos del género.

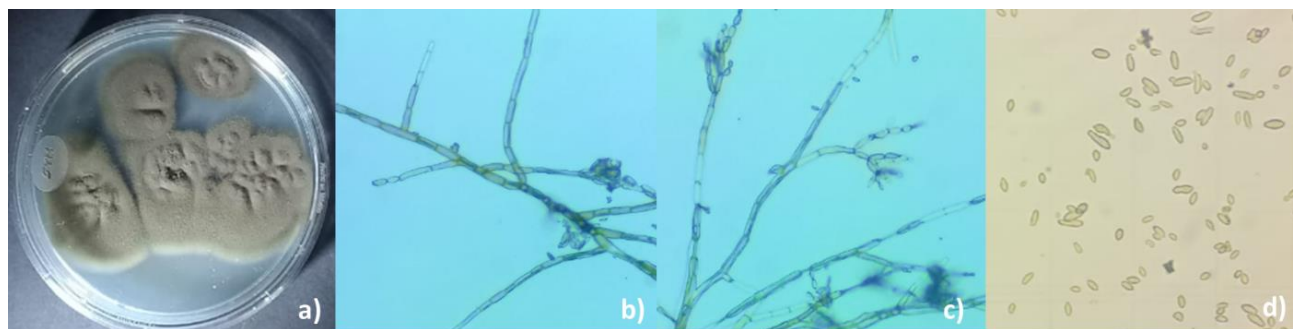


Figura 26. Hongo *Cladosporium* sp. aislado de las hojas de la fresa, a) Características coloniales, b) Hifas septadas, c) Conidióforos compuestos y d) Conidios característicos del género.

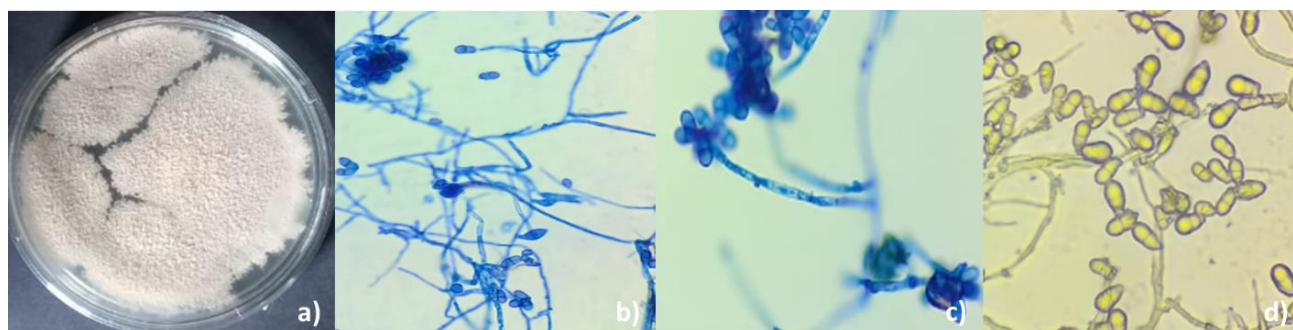


Figura 27. Hongo *Trichothecium* sp. aislado de la raíz de la fresa, a) Características coloniales, b) hifas septadas, c) conidióforos simple y d) Conidios característicos del género.

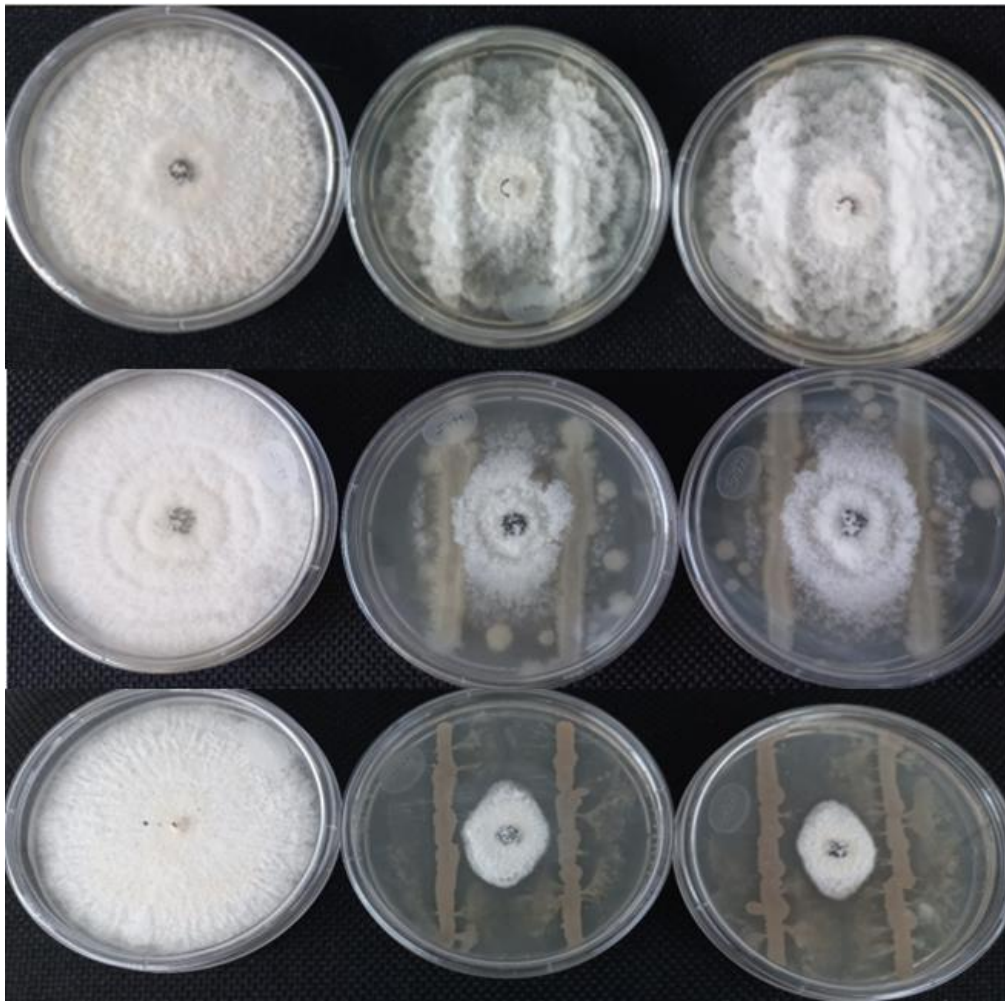


Figura 28. Diferentes interacciones de antagonismos en cultivo dual. En la parte superior se observa una bacteria no antagonista, en la parte de en medio una ligeramente antagonista y debajo una buena bacteria antagonista.

Table 3. Componentes de los medios utilizados para la evaluación de la solubilización de fosfatos.

Componente	Medio Pikovskaya	Medio NBRIP
	g/L	
Extracto de Levadura	0.5	
Dextrosa	10	
Fosfato tricálcico	5	
Sulfato de amonio	0.5	0.1
Cloruro de potasio	0.2	
Sulfato de magnesio	0.1	0.25
Sulfato de manganeso	0.0001	
Sulfato ferroso	0.0001	
Cloruro de magnesio		5
Azul de bromotimol (12.5 mg/mL en 10% NaOH)		2 mL
Agar	15	



**CONGRESO NACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**  
10 - 15 DE  
SEPTIEMBRE 2023



## LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

### EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Karla A. Salazar-Morin, Antonino Baez

Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

**ACTIVIDAD ANTAGONISTA IN VITRO DE ORGANISMOS ENDOFITOS AISLADOS DE LA FRESA  
(FRAGARIA X ANANASSA) CONTRA PESTALOTIOPSIS SP. ASOCIADA A LA PUDRICIÓN DE RAÍZ Y  
CORONA EN EL CULTIVO DE FRESA**

Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023

DR. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA  
PRESIDENTA MDN 2022-2024

DR. LUIS FLORES COTERA  
PRESIDENTE DEL CONGRESO

DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN  
SECRETARIA MDN 2022-2024