



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS BUAP

Maestría en Manejo Sostenible de Agroecosistemas

Tesis:

Evaluación de la actividad antifúngica de la hernandulcina sobre hongos fitopatógenos del fruto de la fresa (*Fragaria x ananassa* cv. camino real) en la etapa de poscosecha

para obtener el grado de Maestro en Manejo sostenible de Agroecosistemas

PRESENTA:

César Agustín Ramírez Díaz

DIRECTOR:

Dr. Nemesio Villa Ruano

COMITÉ TUTORIAL:

Dra. Yesenia Pacheco Hernández

Dr. Omar Romero Arenas

Dr. José Filomeno Conrado Parraguirre Lezama

Septiembre/ 2025



BUAP

La presente tesis, titulada: “**Evaluación de la actividad antifúngica de la hernandulcina sobre hongos fitopatógenos del fruto de la fresa (*Fragaria x ananassa* cv. camino real) en la etapa de poscosecha**”, realizada por el alumno **IBT César Agustín Ramírez Díaz**, bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN
MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

COMITÉ TUTORIAL:

DIRECTOR: _____

Dr. Nemesio Villa Ruano

ASESOR: _____

Dr. Omar Romero Arenas

ASESOR: _____

Dr. José F. Conrado Parraguirre Lezama

ASESORA EXTERNA: _____

Dra. Yesenia Pacheco Hernández

REVISORA EXTERNA: _____

Dra. Yesenia Ithai Ángeles López

Puebla, Pue., octubre de 2025.

Contenido

1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	6
2. <i>MARCO TEÓRICO</i>	
2.1 <i>Fragaria</i>	7
2.2 Clasificación taxonómica de la fresa	8
2.3 El género <i>Fragaria</i>	9
2.4 Descripción botánica	9
2.5 Producción de fresa en México y Puebla	12
2.6 Importancia nutricional y propiedades nutraceuticas	14
2.6.1 Polifenoles	14
2.6.2 Antocianinas y beneficios de su consumo	14
2.7 Hernandulcina	17
2.8 Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a Espectrometría de masas.....	19
2.9 Ensayo con resazurina	19
2.10 Enfermedades en poscosecha.....	19
2.10.1 <i>Botrytis cinerea</i>	20
2.10.2 <i>Rhizopus stolonifer</i>	22
2.11 Benomilo	23
3. <i>JUSTIFICACIÓN</i>	24
4. <i>HIPÓTESIS</i>	25
5. <i>OBJETIVOS</i>	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	25
6. <i>METODOLOGÍA</i>	25
6.1 Material vegetal.....	25
6.2 Cámara húmeda.....	26
6.3 Preparación de medios de cultivo	27
6.4 Aislamiento y purificación de hongos en medio de cultivo.....	27
6.5 Pruebas de patogenicidad.....	27
6.6 Caracterización morfológica.....	28
6.7 Pruebas de identificación molecular	29
6.8 Pruebas de inhibición por microdilución en placa	30
6.9 Aplicación de la hernandulcina en frutos de fresa	30
6.10 Evaluación de la firmeza	31
6.11 Análisis bromatológico.....	31

6.12 Extracción y cuantificación de antocianinas	32
6.13 Análisis estadístico	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Hongos fitopatógenos identificados y pruebas de patogenicidad.....	33
7.2 Identificación morfológica y molecular.....	34
7.2.1 Identificación morfológica de C3	34
7.2.2 Identificación morfológica de C2	35
7.2.3 Identificación molecular de C3.....	36
7.2.4 Identificación molecular de C2.....	38
7.3 Pruebas de inhibición por microdilución en placa	39
7.4.1 Efecto protector de la hernandulcina en fresa inoculada con <i>Botrytis cinerea</i>	42
7.4.2 Efecto protector de la hernandulcina en fresa inoculada con <i>Rhizopus stolonifer</i>	44
7.5 Variación en la firmeza de fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> y con <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina.....	47
7.6 Obtención y análisis de antocianinas	48
7.7 Contenido de nutrientes en fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> tratadas con hernandulcina	49
7.7.1 Variación de proteína total en fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> tratadas con hernandulcina	50
7.7.2 Variación de grasa total en fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> tratadas con hernandulcina..	51
7.7.3 Variación de fibra total en fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> tratadas con hernandulcina ..	51
7.7.4 Variación de azúcares reductores en fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> tratadas con hernandulcina.....	50
7.8 Contenido de nutrientes en fresas infectadas con <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina.....	52
7.8.1 Variación de proteína total en fresas infectadas con <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina.....	52
7.8.2 Variación de grasa total en fresas infectadas con <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina	53
7.8.3 Variación de fibra total en fresas infectadas con <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina.	53
7.8.4 Variación de azúcares reductores en fresas infectadas con <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina.....	53
7.9 Variación del contenido de antocianinas en fresas infectadas con <i>B. cinerea</i> tratadas con hernandulcina.....	54
7.10 Variación del contenido de antocianinas en fresas infectadas por <i>R. stolonifer</i> tratadas con hernandulcina.....	56
7.11 Contenido de fenoles en frutos infectados por <i>B. cinérea</i> y <i>R. stolonifer</i> tratados con hernandulcina.....	58
7.12 Capacidad antioxidante de frutos infectados por <i>B. cinérea</i> y <i>R. stolonifer</i> tratadas con	

hernandulcina.....	59
8. <i>DISCUSIÓN</i>	60
9. <i>CONCLUSIONES</i>	65
10. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	67

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado y a la Maestría en Manejo Sostenible de Agroecosistemas, instituciones que me otorgaron la oportunidad de ser alumno, por la integra y multidisciplinaria formación que se me brindaron durante estos dos años.

Agradezco a los profesores que me guiaron y formaron en temas científicos, tecnológicos y humanos, agradezco por ser facilitadores del conocimiento.

A mi mentor y director de tesis, el Doctor Nemesio Villa por compartir sus conocimientos, por guiarme en el área de la investigación y experimentación. Agradezco la confianza.

Al CUVyTT por dejarme participar y trabajar en sus instalaciones, por el respeto y confianza en el trato diario.

A la Maestra Wendy Coyotl por guiarme y asesorarme en la parte experimental.

A mis compañeros y amigos que me han ayudado y acompañado en este proceso.

1. INTRODUCCIÓN

La fresa es un producto hortícola consumido en todo el mundo debido a sus propiedades organolépticas incluyendo su sabor y aroma. Además de las cualidades culinarias de este fruto también posee valor nutricional debido a la variedad de moléculas que presenta, desde vitaminas y minerales hasta fibra, azúcares y compuestos antioxidantes. Estos compuestos bioactivos permiten catalogar a la fresa como un alimento funcional, brindando beneficios a la salud del consumidor. Estas características vuelven a la fresa el objetivo económico de muchos productores en México y en el mundo, especialmente en los productores del estado de Puebla, que han comenzado a implementar este cultivo en sus parcelas. Basando en la bibliografía, como se ve en los siguientes temas a desarrollar, el cultivo de la fresa en distintas zonas del estado permite crear una nueva fuente de ingresos para los productores y para el estado, a través de la venta de este producto de manera local o en la importación. Sin embargo, una vez obtenida la cosecha de fresa, existe la problemática de las pérdidas postcosecha causada por fitopatógenos. Esto puede producir grandes pérdidas en los lotes cosechados, lo cual representa pérdidas económicas para los productores. Los hongos fitopatógenos infectan a la fresa transportada o almacenada provocando una pérdida del fruto infectado. Además, se pone en riesgo la apariencia y calidad del lote. En este trabajo propone un tratamiento utilizando hemandulcina (HE), un edulcorante con actividad antimicrobiana que puede ser aprovechada para extender la vida útil de frutos de fresa infectados con dos hongos filamentosos, responsables de grandes pérdidas durante la poscosecha: *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*.

2. MARCO TEORICO

2.1 Fragaria

Fragaria spp. es un género de plantas pertenecientes a la familia Rosaceae, ampliamente distribuida por el mundo, con variedad de especies silvestres (como *F. vesca*) y variedades híbridas que son de gran valor económico debido (Potter *et al.*, 2017). La fresa es ampliamente usada en la gastronomía mundial. A pesar de ser uno de los frutos más exportados mundialmente, no fue hasta el siglo XVIII que comenzó su explotación. Antoine Nicolas Duchesne, quiso obtener ejemplares con frutos más grandes, coloridos y dulces de este preciado fruto experimentando con la producción de híbridos. Entre las cruza exitosas que obtuvo como resultado de sus experimentos estuvieron aquellas cuya planta progenitora fue *F. chiloensis* (Figura 1).



Figura 1. Imagen de la planta de fresa y un estolón alargado. Fuente: SAGARPA (2017).

La especie de fresa *F. chiloensis* es una planta del sur del continente americano que crece en suelos arenosos y con tolerancia a la radiación solar y a la salinidad del suelo. Mientras que, *F. virginiana* es una especie del norte del continente con sabor dulce y con una mejor resistencia al calor y al frío. Con la cruce de estas dos especies se generó el híbrido *Fragaria x ananassa*. Gracias a esto, *Fragaria x ananassa* se obtuvo como una variedad hermafrodita con ventajas de un buen tamaño y un sabor agradable (Kirschbaum, 2021; Liston *et al.*, 2014). *Fragaria x ananassa* es una planta herbácea que cuenta con características notorias, es un cultivo perenne, llegando a clasificarse como una planta leñosa por el desarrollo de xilema secundario. También es conocida por su capacidad de reproducirse por estolones, así como por flores, las cuales son de color blanco, poseen hojas trifoliales y raíces poco profundas.

La fresa es básicamente un fruto agregado o eterio y estos frutos pueden identificarse gracias a la clasificación de sus formas (Kirschbaum, 2021).



Figura 2. Fotografía de fresas infectadas con *Rhizopus stolonifer*. Fuente: elaboración propia.

2.2 Clasificación taxonómica de la fresa

Esta planta pertenece a la división taxonómica de las Magnoliófitas, en la clase de las Magnoliopsidas, dentro del orden de los Rosales en la familia Rosaceae y en la subfamilia Rosoidae, perteneciente al género *Fragaria*, en la cual se diferencian distintas especies y variedades (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la fresa. Fuente: Kirschbaum (2021).

Reino	Plantae
División	Tracheopyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	<i>Fragaria</i>
Especie	<i>Fragaria × ananassa</i>

2.3 El género *Fragaria*

Dentro del género *Fragaria* podemos encontrar 23 especies de plantas, distribuidas a lo largo del continente americano, de entre estas especies podemos identificar a los tipos silvestres como *F. chiloensis*, *F. virginiana*, *F. vesca* y a las variedades de la especie hibridada, *F. x ananassa*. Las especies de *Fragaria* también pueden clasificarse por la cantidad de cromosomas que poseen, es decir, por su ploidía. Los cuatro tipos que se pueden presentar son del tipo diploide, tetraploide, hexaploide o incluso octaploide. Las especies *F. chiloensis*, *F. virginiana* y *F. ananassa* pertenecen a grupo de las octaploides. Esta característica resulta fundamental para la compatibilidad de la reproducción sexual de estas plantas y así obtener nuevos organismos híbridos (Sánchez, 2015).

2.4 Descripción botánica

La fresa es una planta perenne, herbácea, y llega a ser descrita como leñosa (Figura 3). En la siguiente imagen se muestra un esquema general de la morfología de una planta de fresa y se indican a grandes rasgos las estructuras más relevantes.

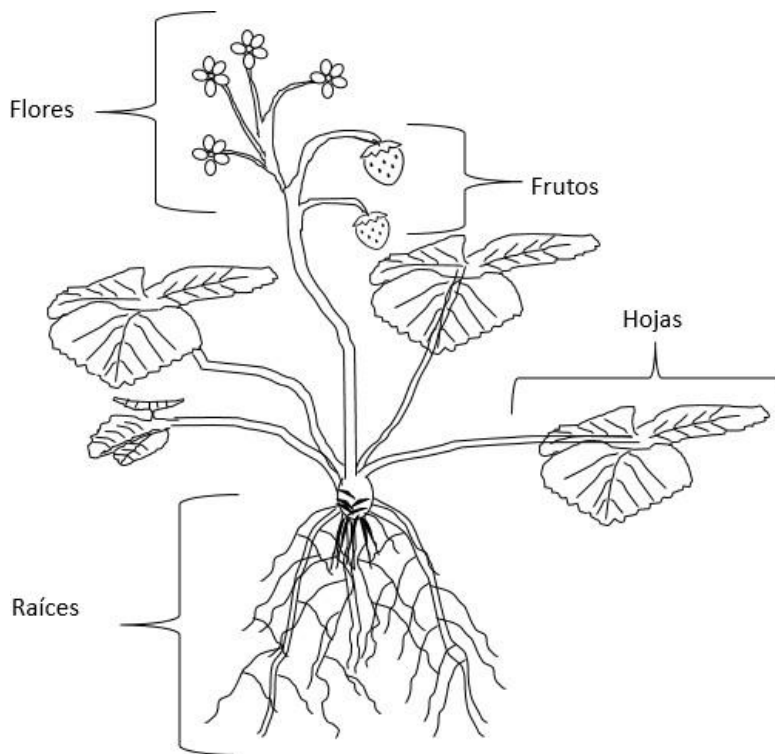


Figura 3. Diagrama de la morfología de la fresa. Fuente: redibujado de Kirschbaum (2021).

Las raíces brotan desde la base de la corona y se clasifican en primarias y secundarias. El número de raíces primarias de una planta de fresa oscilan entre 20 y 30, a partir de estas se derivan las secundarias, las cuales pueden ser cientos. La principal función de estas estructuras es la captación de nutrientes. El tamaño de estas estructuras varía, alcanzado una longitud de entre los 25 a los 80 cm, la cual depende principalmente los factores ambientales (Altamirano-Hernandez, 2017; Sánchez, 2015). En el caso de la fresa, el sitio donde surge el tallo es conocido como corona, en esta zona de la planta es en donde se encuentran ubicadas las yemas que posteriormente formarán las hojas, las flores y el resto de la planta (Altamirano-Hernandez, 2017). Las hojas de la planta de fresa se pueden encontrar en los tallos y en sus ramificaciones. Éstas presentan una característica forma trifoliada y pinnada (Figura 4). Estas hojas tienen un periodo de vida de algunos meses, este periodo está relacionada a la nutrición de la planta. Los primordios foliares se pueden agrupar en 10 por yema y pueden reemplazar a las hojas marchitas (Kirschbaum, 2021).



Figura 4. Hojas de fresa. Fuente: Kirschbaum (2021).

Los estolones se forman desde las yemas axilares o de la corona, estas estructuras alargadas forman parte de la estrategia de reproducción clonal de esta planta. Los estolones sirven para generar nuevas plantas con la misma información genética y transportar nutrientes del suelo a la planta principal. De esta manera y en condiciones favorables, una planta puede tener hasta 15 estolones (Sánchez, 2015). Los cimpos son tallos que terminan en inflorescencias y en la planta de fresa generan una flor primaria con dos flores secundarias que a su vez son seguidas de cuatro flores terciarias y culminadas por ocho flores cuaternarias. Tales inflorescencias están conformadas por flores de 5 pétalos por 10 sépalos cada una, como se ilustra en la Figura 5 (Sánchez, 2015).



Figura 5. Flores de la fresa. Fuente: SAGARPA (2017). Las flores hermafroditas presentan pistilos y estambres.

En estas plantas el polen maduro no se libera hasta que las flores estén completamente abiertas y permanece viable, no obstante, los estigmas continúan activos hasta por diez días. Los insectos son responsables de alrededor del 28 % de la fertilización de las plantas. Tras la polinización, se tienen 48 horas para que ocurra la fertilización (Kirschbaum, 2021; Sánchez, 2015). Los óvulos fecundados de la flor desarrollan el pseudocarpo, el cual es reconocido como la parte comestible de la fresa (Figura 6). Por el contrario de lo que se podría pensar, los verdaderos frutos son los aquenios, conocidos como semillas. Estos frutos indehiscientes se encuentran distribuidos por la superficie del pseudocarpo y normalmente están presentes entre 150 a 200 de ellos. Los aquenios contienen en su interior dos cotiledones además de nutrientes como proteínas y también lípidos (Altamirano-Hernandez, 2017; Kirschbaum, 2021). El receptáculo carnoso es la parte de interés por ser comestible, la cual puede tener una amplia variedad de formas, tamaños y colores que varían de entre el rojo, rosa o incluso violeta. Este tejido está compuesto por tres capas: la médula, la corteza y finalmente la epidermis (Altamirano-Hernandez, 2017; Kirschbaum, 2021).

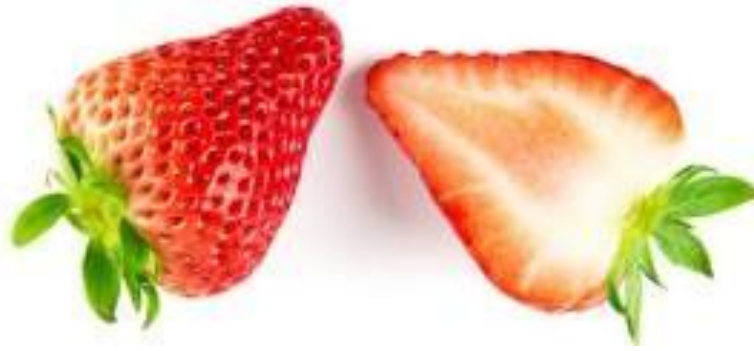


Figura 6. Sección carnosa de la fresa. Fuente: SAGARPA (2017).

2.5 Producción de fresa en México y Puebla

En México el cultivo de la fresa es relativamente reciente. Su cultivo comenzó en el estado de Guanajuato aproximadamente hace 100 años y posteriormente su producción se extendió a estados cercanos como Michoacán. Posteriormente, más productores de distintos estados del país encontraron un mercado gracias a la exportación derivada del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) (Ávila-Arce y González-Milán, 2012). En el 2017 el 51.21% de la producción nacional de fresa se dedicó a la exportación internacional (SAGARPA, 2017) siendo Canadá, Países Bajos y Estados Unidos de América los principales importadores. En 2016, México llegó a ser el quinto productor de fresa a nivel mundial, con una aportación de 142,053 mil dólares anuales. En ese año, Michoacán, Baja California y Guanajuato encabezaban la lista de productividad. Antes de 2016, en 2009 apenas ocupó el noveno lugar número en producción mundial de fresa.

En 12 años, en el periodo comprendido entre el año 1994 y el año 2016 las exportaciones de fresa en el mundo tuvieron una tasa de incremento del 119.73%. Estos resultados muestran un interés creciente en el comercio de este producto. México se posicionó como el quinto con mayor producción de fresa en el mundo, junto con China y los Estados Unidos de América. Dentro del mismo lapso, entre 1994 y 2016, México tuvo un porcentaje de crecimiento en la tasa de exportación de fresa de 427.1% resultando en una actividad económica de gran importancia. En el 2019 México produjo 468,248 toneladas de fresa, por debajo de China y Estados Unidos con 3,779,831 toneladas y 1,431,050 toneladas respectivamente. De las casi 470,000 toneladas producidas en 2019, México exportó 102,631 toneladas de este preciado fruto. Tal incremento se ha logrado gracias a la promoción de

técnicas y énfasis en la agricultura, así como la intensificación de este cultivo (Arroyo y Hernández, 2021; Ramírez *et al.*, 2020).

En el estado de Puebla, la fresa se produce por distintas técnicas como la libre exposición, suelo con acolchado plástico, hidroponía o riego por goteo, destacando la producción tecnificada con el uso de invernaderos. Algunos de los municipios en donde se concentra esta producción en Puebla son Zacatlán, Huejotzingo, Cholula y Atlixco, señalados en la Figura 7. (Morales-Mora *et al.*, 2020; Salazar *et al.*, 2017).

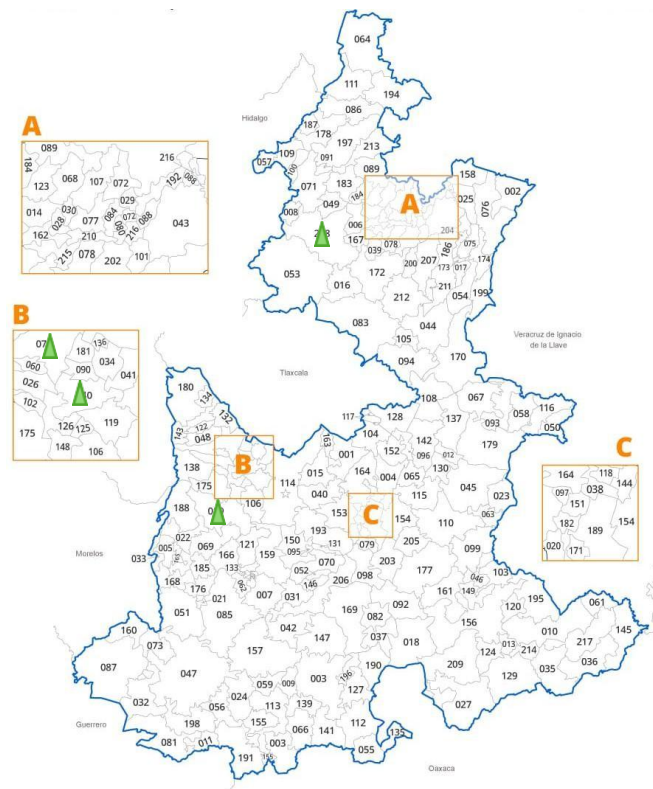


Figura 7. Mapa del estado del Puebla, México. El mapa se presenta con división política de municipios. Se resaltan con un triángulo verde los municipios con producción de fresa. Los recuadros A, B y C muestran una ampliación del territorio. En la ampliación B se muestran dos municipios con producción de fresas, Fuente: Editado de Lamudi (2022).

Según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, la mayor cantidad de fresa cosechada en Puebla es por tecnologías de invernaderos (SIAP, 2024). En consecuencia, Puebla tuvo una producción de 217.86 toneladas de fresa en el año 2024 que, aunque no se compara con estados como Baja California, Guanajuato o Michoacán (137 mil, 107 mil y 371 mil toneladas respectivamente) por ser mucho menor aun así representó un valor de

aproximadamente 3.5 millones de pesos. Para el 2024, la producción nacional de fresa fue de 645,452.16 toneladas. Sin embargo, si comparamos a nivel del mismo estado de Puebla de 2015 a 2024 la producción aumentó en un 788.86 % (SIAP, 2024). Esto demuestra el evidente crecimiento en la producción del cultivo de fresa en el estado.

2.6 Importancia nutricional y propiedades nutraceuticas

Los alimentos funcionales son una tendencia en la actualidad, por lo que el estudio, el análisis y la producción de estos es de suma importancia. Los alimentos funcionales se caracterizan por pertenecer a la dieta regular de una persona, además de ser nutritivos, poseen compuestos bioactivos que aportan beneficios a la salud y/o ayuda a prevenir enfermedades (Arias *et al.*, 2018). Los compuestos bioactivos presentes en algunos de estos alimentos son llamados nutraceuticos. Estos nutraceuticos también se pueden ingerir en forma de suplementos alimenticios. En el caso de las fresas, que son un alimento funcional, podemos encontrar que tienen distintos compuestos activos, como los polifenoles. Dentro de este grupo las antocianinas presentes en la fresa pueden ser consideradas como un nutraceutico. Para fines de este trabajo, consideramos a los nutrientes como proteínas, grasas, fibra, azúcares totales y antocianinas, incluso la firmeza del fruto como parámetros que nos permiten medir la calidad de la fresa.

2.6.1 Polifenoles

Los polifenoles son compuestos químicos sintetizados de manera natural en las plantas. Estas sustancias no siempre son prioridad para la supervivencia de la planta, por ello se les considera metabolitos secundarios. Sin embargo, son de gran interés para la nutrición humana ya que se han descubierto distintas propiedades de interés farmacéutico y organoléptico, por mencionar algunos (Surco-laos *et al.*, 2020). La clasificación general de los polifenoles es sencilla, se ha dividido en cuatro tipos, los ácidos fenólicos, los flavonoides, los estilbenos y los lignanos (Castro, 2021).

2.6.2 Antocianinas y beneficios de su consumo

Las antocianinas se encuentran dentro del grupo de los flavonoides, las cuales se pueden

ingerir en una dieta común ya que están presentes en alimentos como las moras, las cerezas y las fresas, como ejemplo. Las antocianinas aportan color a los alimentos en los que están presentes, estos colores van de los rojos a los azules, morados y los tonos rosas-rojos como el de las fresas (Castro, 2021). Las fresas son alimentos ricos en antocianinas, que están presentes en distintas concentraciones dependiendo del fenotipo (variedad), el genotipo o el lugar de cosecha. Las principales antocianinas que se pueden encontrar en la fresa son: pelargonidina-3-O-glucósido, pelargonidina-3-O-rutinósido y cianidina-3-O-glucósido. Cabe destacar que, de las mencionadas, la pelargonidina-3-O-glucósido se encuentra en mayor concentración (Nour *et al.*, 2017).

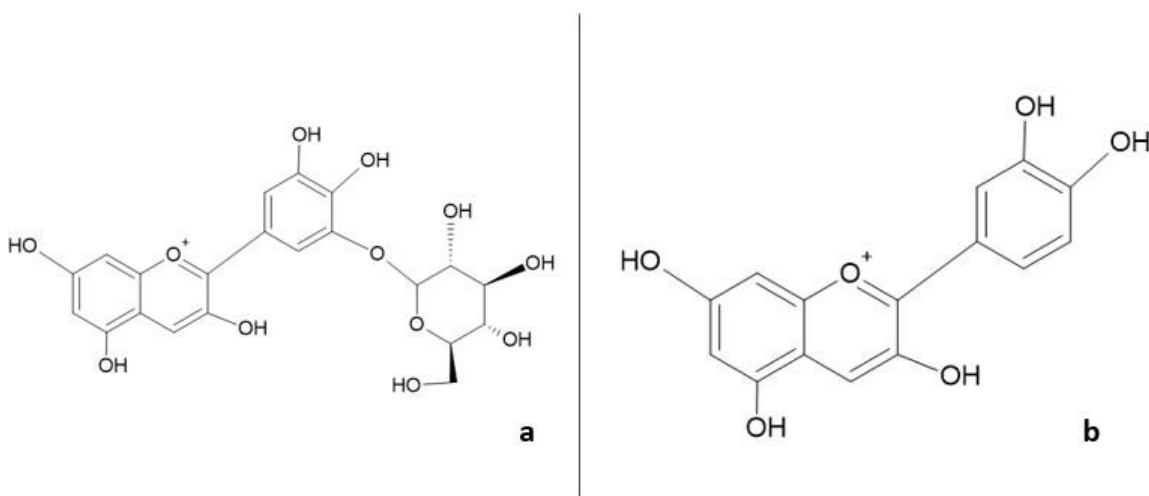


Figura 8. Estructura química de una antocianina y una antocianidina. A) Estructura de la antocianina cianidina-3-O-glucósido. b) Estructura de la antocianidina cianidina. Fuente: Mattioli *et al.* (2020). Redibujada en ChemSketch.

Las antocianidinas son formas precursoras de las antocianinas. Para transformar una molécula de antocianidina en una de antocianina se le une una molécula de azúcar mediante una glicosilación de un grupo hidroxilo en el C3, como se muestra en la Figura 8. Ejemplos de antocianidinas son la pelargonidina y la cianidina, mientras que sus correspondientes antocianinas son pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido (Alam *et al.*, 2021). Las antocianinas son de interés farmacológico gracias a sus efectos antioxidantes, sin embargo, se han estudiado y descubierto nuevas propiedades que brindan otros beneficios a la salud. Entre estos efectos se encuentran propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas y efectos contra enfermedades como el cáncer y la diabetes (Alam *et al.*, 2021). La capacidad antioxidante de

las antocianinas se basa en su capacidad para inactivar especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta beneficioso para el organismo del consumidor.

Los antioxidantes tienen dos mecanismos de acción y se clasifican en función de estos. El mecanismo primario se basa en que la molécula antioxidante dona un electrón para estabilizar a la molécula oxidante. El mecanismo secundario ocurre cuando la misma molécula se une al agente oxidante estabilizándolo (Zhao y Yuan, 2021). Fallah *et al.* publicaron un metaanálisis a partir de revisiones bibliográficas que corroboran la actividad antioxidante *in vivo* de las antocianinas en personas que las agregaron en su dieta (2020). La actividad antioxidante ayudó a reducir los niveles de malondialdehído, isoprostano y lipoproteínas de baja densidad oxidadas, así como la estimulación en la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa.

Desde hace más de una década se estudia de manera *in vitro* la actividad antiinflamatoria de las antocianinas. Este efecto provocado no sólo por sí mismas, sino también gracias a los compuestos resultantes tras su metabolización por microorganismos en el intestino (Hidalgo *et al.*, 2012). Los trabajos relacionados al potencial antiinflamatorio de las antocianinas han sido llevados a pruebas clínicas, dando resultados favorables. En el año 2021 el equipo de Nikbakht *et al.* (2021), evaluó el potencial antiinflamatorio de las antocianinas suministradas a través de la dieta a un grupo de 40 personas, como resultado se obtuvieron mejores niveles de marcadores proinflamatorios. Así mismo es importante recalcar que los pacientes que participaron en ese ensayo padecían diabetes tipo 2, lo cual sugiere que tiene efectos benéficos para personas con diabetes (Nikbakht *et al.*, 2021).

Las antocianinas tienen una interacción importante con la microbiota del intestino, además, sus efectos antioxidantes influyen en la regulación del metabolismo en el cuerpo y les brindan efectos antiinflamatorios. Las propiedades antes mencionadas son relevantes debido a que son de gran ayuda en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Esta importante actividad en el tratamiento de la enfermedad metabólica es de gran relevancia, por lo que se sigue estudiando su mecanismo de acción (Chen *et al.*, 2022). Por otro lado, existe evidencia de la eficiencia de las antocianinas para regular la homeostasis de la glucosa, ayudando a reducir su alta concentración en el organismo. Estos estudios se respaldan en efecto positivo en la producción de insulina y mejora la condición de resistencia a la insulina en organismos que

consumen antocianinas en su dieta. Aunque muchos de estos estudios son realizados en ratones los efectos en seres humanos son prometedores (Panchal *et al.*, 2022).

Si bien las antocianinas no evitan directamente las enfermedades cardiovasculares, estas influyen en el mejoramiento del perfil de lípidos del organismo, es decir, reduciendo la cantidad de lípidos en sangre, contribuyendo a la salud cardiovascular (Panchal *et al.*, 2022). Los estudios, en general, muestran que la acción bioactiva se encuentra en evitar la oxidación de ácidos grasos en el organismo, contribuyendo a mejorar la calidad de vida de personas con este tipo de padecimientos cardiovasculares (Reis *et al.*, 2016).

Las células del cerebro son susceptibles a las ROS debido a su composición y al medio en que se encuentran. Es por esto que las antocianinas tienen un papel de gran importancia sirviendo como moléculas neuroprotectoras contra enfermedades neurodegenerativas, ya que su actividad antioxidante contribuye a mitigar el estrés oxidativo. En la literatura existen estudios llevados a cabo en modelos animales que confirman esta capacidad neuroprotectora de las antocianinas, conjuntamente a los efectos sobre la mejora de la memoria (Mattioli *et al.*, 2020).

El efecto neuroprotector de las antocianinas no se atribuye a un solo mecanismo de acción, sino que se produce gracias a un conjunto de actividades biológicas en el organismo. Entre ellas se destaca la actividad antiinflamatoria, la actividad anti-apoptótica y la actividad antioxidante (Katasonov, 2022).

2.7 Hernandulcina

La hernandulcina (HE) es una sustancia presente en la planta *Lippia dulcis* (Syn. *Phyla scaberrima*). Esta sustancia se propuso como un edulcorante por ser 1000 veces más potente que la sacarosa, por lo que se le puede considerar un nuevo y promisorio aditivo alimentario (Arribas, 2019). Esta molécula se encuentra presente de manera natural en las hojas y las flores de *L. dulcis* (Farfán *et al.*, 2012). Un aditivo alimentario es una sustancia, ya sea natural o sintética, que no es consumida en la dieta por su valor nutrimental, si no que se añade en cantidades limitadas con el fin de aportar cualidades a un alimento. Dentro del grupo de aditivos alimentarios los edulcorantes se distinguen por ser sustancias que proporcionan un sabor dulce. Los edulcorantes deben cumplir con ciertas características como ser inocuos, que

el sabor sea rápidamente detectable, que no deje sabores extraños y que no se degrade en las condiciones del alimento. Ejemplos de estas sustancias de origen sintético son el aspartame y el acesulfama-K y en su contraparte natural existe la taumatina y el esteviósido (Ibáñez *et al.*, 2003). La HE tiene la fórmula molecular de $C_{15}H_{24}O_2$, y su nomenclatura es (6S)-6-[(2S)-2-hidroxy-6-metilhept-5-en-2-yl]-3-metilciclohex-2-en-1-ona. Esencialmente se trata de un sesquiterpeno del tipo bisabolano, por su parecido estructural con el bisabolol (Figura 9). Gracias a la síntesis química se conoce que la configuración de la molécula es 6S, 1'S-(+)-hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987). Estos estudios también dieron a conocer que la HE es un compuesto que no causa actividad tóxica o mutagénica en modelos animales.

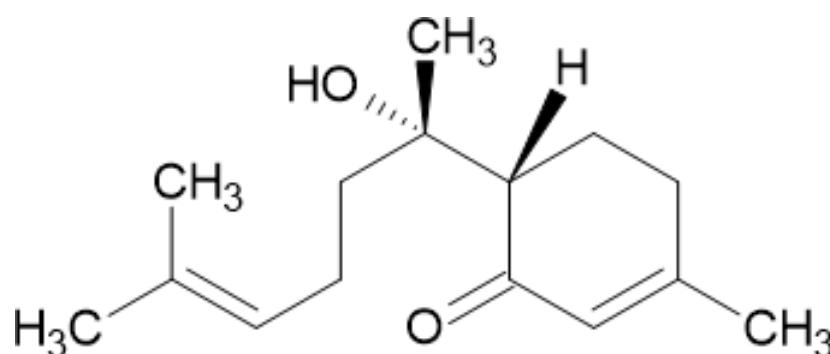


Figura 9. Estructura de la hernandulcina. Fuente: Villa-Ruano *et al.* (2021). Redibujada en ChemSketch.

En investigaciones previas se utilizó la molécula con cambios en su estructura para determinar qué parte de la estructura era responsable del sabor dulce. Como resultado se mostró que el doble enlace en los carbonos C4'-C5', el grupo hidroxilo del C1' y el grupo carbonilo en el C1 eran responsables de brindarle el dulzor (Compadre *et al.*, 1985; 1987; 1988). A pesar de ser considerado como un potente edulcorante, las propiedades biológicas del sesquiterpeno no han sido reveladas a la fecha. Sin embargo, estudios recientes sostienen que posee un efecto citotóxico débil sobre las bacterias del tracto gastrointestinal (Villa-Ruano *et al.*, 2021). Interesantemente, Villa-Ruano *et al.* (2021), demostraron que cultivos de células en suspensión de *L. dulcis* son capaces de acumular una mayor cantidad de HE tras ser tratados con elicitores fúngicos como la quitina y la celulosa, que están relacionadas a la presencia de hongos. De este modo, se asume que parte del papel ecológico de HE estaría

dirigido hacia la respuesta ante el ataque de hongos.

2.8 Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía es una de las técnicas de separación de compuestos más destacadas debido a su efectividad. La cromatografía está compuesta por dos fases, la fase estacionaria y la fase móvil. Depende de esta última una clasificación distinta, la fase móvil, que es donde se contiene la muestra de estudio, puede ser un gas o un líquido. La cromatografía funciona cuando la fase móvil pasa a través de la fase estacionaria. Entonces los componentes presentes en la muestra a analizar interactúan de distintas maneras con la columna (fase estacionaria) dependiendo de la afinidad o características propias de cada compuesto. En el caso de la cromatografía líquida de alto rendimiento, como su nombre lo indica, la fase móvil es un líquido (Suarez y Morales, 2018). Esta técnica también conocida por sus siglas en inglés HPLC que significan High-Performance Liquid Chromatography.

En resumen, la espectrometría de masas es una técnica que permite la identificación y además la cuantificación de un analito específico. Esta se fundamenta en la relación que existe entre la masa, determinando su peso molecular, y la carga de una molécula. Con esta técnica es posible separar, identificar y además cuantificar uno o varios analitos presentes en una muestra de manera fiable y certera (Suarez y Morales, 2018).

2.9 Ensayo con resazurina

La resazurina es una molécula que en condiciones específicas y en estado oxidado mantiene un color azul intenso. Esta molécula actúa como un indicador de que el metabolismo celular se está llevando a cabo. Cuando la resazurina se reduce gracias a la detección de actividad enzimática involucrada en la respiración celular se transforma en resorufina tornándose de un color rosa. Este proceso es irreversible, por lo que es utilizado como un indicador de viabilidad celular (Knapp *et al.*, 2018).

2.10 Enfermedades en poscosecha

La etapa de poscosecha comienza con la recolección de los frutos e incluye el embalaje, almacenamiento, el periodo en que los frutos son transportados y su comercialización. Esta etapa es crucial para mantener los parámetros de calidad del fruto, por ejemplo, la

firmeza, el color y la sanidad. En la poscosecha, las fresas se encuentran expuestas a algunos riesgos relacionados a la manipulación como el daño mecánico causado por raspones, punciones o cortes, lo que principalmente favorece la entrada de hongos y otros microorganismos al interior del fruto, generando una infección que posteriormente contagie a más frutos (Gámez-Villazama y Carrera, 2022). Durante este periodo las fresas son colocadas en condiciones de refrigeración a temperaturas de entre 0 y 3° C, para proteger al fruto y a la vez retrasar el crecimiento de microorganismos, dando una vida útil de entre 3 y 7 días aproximadamente (Franco-Gaytan *et al.*,2018).

La fresa es un cultivo altamente susceptible al ataque de hongos. Las características nutricionales y fisicoquímicas de la fresa como la alta concentración de agua, la disponibilidad de azúcares, la piel delgada del fruto y el pH ligeramente ácido la vuelven un blanco fácil para los fitopatógenos (Trinetta *et al.*, 2020). Las infecciones fúngicas son un problema central en el desarrollo y la comercialización de este producto debido a que causan grandes pérdidas en la etapa de cultivo y pérdidas aún más graves en la etapa poscosecha (Cano, 2014). Las afectaciones son severas al provocar pérdidas económicas por la pudrición del producto.

La poscosecha de fresa es vulnerable debido a que no es recomendable el uso de pesticidas químicos por la seguridad del ambiente y la salud humana (Vardar *et al.*, 2012). Entre los diversos géneros de hongos fitopatógenos que afectan a las fresas durante la poscosecha, en la literatura se han descrito dos organismos recurrentes: *Botrytis cinerea*, conocido por causar la enfermedad del moho gris y *Rhizopus stolonifer*, hongo responsable de la enfermedad de la pudrición blanda (Vardar *et al.*, 2012).

2.10.1 *Botrytis cinerea*

La clasificación de *B. cinerea* se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de *Botrytis* (Pérez-Martín y Di Pietro, 2004).

Reino	Fungi
División	Ascomycota

Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>

B. cinerea es el fitopatógeno responsable de la enfermedad conocida como podredumbre gris. Su crecimiento y diseminación provocan además de la marchitez del tejido vegetal, un tono gris algodonoso sobre el área afectada (Figura 10). Al igual que a la fresa este hongo afecta a una gran variedad de plantas de interés económico, como el arándano, el tomate, el pepino y la vid entre más de 200 especies vegetales (Kwon *et al.*, 2011; Pérez-Martín y Di Pietro, 2004).



Figura 10. Fresa infectada por *B. cinerea*. Fuente: elaboración propia.

El ciclo de vida y el ciclo infeccioso de *B. cinérea* comienza con la dispersión de las esporas en el ambiente, siendo arrastradas por el viento o el agua como vector. Una vez que la spora se encuentra en la superficie del organismo huésped esta produce un tubo germinativo y perfora la pared del huésped. Cuando el patógeno ha colonizado, el tejido del epitelio próximo a la zona afectada de la planta muere. A este proceso se le conoce como infección primaria restringida (Pérez-Martín y Di Pietro, 2004). La infección se puede desarrollar de dos maneras, en la primera el hongo puede permanecer latente en la infección en flores y atacar

cuando el fruto está desarrollado. La segunda puede ser activa y comenzar con una infección secundaria en la que ataca a su hospedero y crece de manera intensiva. En este punto el tejido vegetal es afectado y produce la podredumbre gris. Posteriormente, el hongo puede comenzar a generar estructuras reproductivas como macroconidios o esclerocios para continuar con el ciclo (Pérez-Martín y Di Pietro, 2004).

2.10.2 *Rhizopus stolonifer*

La clasificación taxonómica de *R. stolonifer* es indicada en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de *Rhizopus*. Fuente: Bautista-Baños *et al.* (2014).

Reino	Fungi
División	Mucoromycota
Clase	Zygomycetes
Orden	Mucorales
Familia	Mucoraceae
Género	<i>Rhizopus</i>
Especie	<i>Rhizopus stolonifer</i>

R. stolonifer es uno de los agentes fitopatógenos con mayor presencia en vegetales almacenados, causando la pudrición blanda, que es responsable de pérdidas económicas de relevancia. Esta enfermedad causa estragos infectando a vegetales como la papaya, el mango, fresas, arándanos, papas, tomate, uvas, entre otros (Bautista-Baños *et al.*, 2014).



Figura 11. Fresa infectada por *R. stolonifer*. Fuente: elaboración propia.

Las esporas de ese hongo pueden dispersarse por el viento o por insectos vectores. La presencia de daño físico como lesiones en la capa exterior del tejido vegetal favorece la germinación y el ataque de *R. stolonifer*, cuyas estructuras reproductivas resisten condiciones ambientales adversas. La infección por *R. stolonifer* causa un ablandamiento de la zona afectada de la fresa, provocando una pérdida de agua. Esto se debe a que, una vez penetrando la pared del fruto, el hongo continúa reproduciéndose y creciendo hasta romper la superficie. Durante la infección, el hongo consume los azúcares del fruto, principalmente fructosa y celobiosa, que son producto de la degradación del tejido vegetal (Ventura-Aguilar *et al.*, 2021). Tras la infección, en la zona afectada se desarrolla el micelio aéreo de color blanquecino y de apariencia algodonosa, que cuando comienza a reproducirse se torna oscuro por la formación de esporangios en la superficie (Figura 11), listos para infectar a un nuevo huésped (Bautista- Baños *et al.*, 2014).

2.11 Benomilo

El benomilo es conocido por ser un fungicida de amplio espectro el cual es utilizado comúnmente en agronomía. El principio activo del benomilo se clasifica dentro del grupo de bencimidazoles. El mecanismo de acción de esta sustancia se evidencia durante la división celular despolimerizando e inhibiendo la función de los microtúbulos de los hongos, por los que tiene gran afinidad (Soto, 2019). El benomilo es eficaz contra una amplia variedad de hongos, sin embargo, puede resultar tóxico en el ambiente, afectando a otros organismos del suelo como las lombrices y algunos otros organismos acuáticos. Si bien el benomilo se

degrada con cierta facilidad en carbendazim que puede ser metabolizado por los organismos sin grandes complicaciones esto no resta importancia en su uso (WHO, 1993). A pesar de que el benomilo ha sido comprobadamente efectivo contra *B. cinerea* se han registrado casos de cepas de este hongo resistentes a benomilo, causando pérdidas graves (Bollen y Scholten, 1971). Debido a este tipo de situaciones es necesario buscar nuevas moléculas con actividad antifúngica.

Atendiendo a las indicaciones de los productores de fresa, este fungicida es utilizado durante la etapa de la floración de la fresa y durante el crecimiento del fruto. Los factores ambientales indican los momentos cuando debe ser aplicado, principalmente cuando las lluvias son abundantes o cuando la humedad del ambiente persiste durante varios días. Estos factores predisponen las condiciones para el crecimiento de hongos que afecten al cultivo.

La recomendación es que deben de suspenderse las aplicaciones de benomilo de una a dos semanas antes de la cosecha, dependiendo de las condiciones ambientales. El fungicida ya no debe ser utilizado en el fruto durante la poscosecha, por las implicaciones que tienen los químicos a la salud de los seres humanos si son consumidos.

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la fresa es una actividad económica de importancia creciente en el estado de Puebla. La producción de este fruto representa una fuente de ingresos para productores y trabajadores del campo. Además, la ingesta de esta hortaliza aporta beneficios a la salud de los consumidores gracias a que posee, entre otros nutrientes, antioxidantes. Sin embargo, la producción de la fresa se ve afectada por hongos fitopatógenos en la etapa poscosecha, los cuales causan pérdidas por pudrición y por pérdida de calidad del producto. Estas mermas en el producto final significan pérdidas económicas para los productores. *B. cinerea* y *R. stolonifer* son hongos altamente involucrados en la pudrición de la fresa. Durante esta etapa no se puede hacer uso de fungicidas químicos, por lo que, como línea de investigación se propuso el uso de una molécula de origen natural, la hernandulcina. Al tener un origen natural y tener un posible efecto antifúngico, nuestra propuesta fue el estudio de la HE como un tratamiento para la protección contra hongos fitopatógenos del fruto de la fresa en su etapa poscosecha.

4. HIPÓTESIS

La hernandulcina producirá un efecto protector en la calidad del fruto de fresa infectada con hongos fitopatógenos en condiciones de poscosecha.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto antifúngico de la hernandulcina sobre hongos fitopatógenos de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* cv. Camino real) comercializados en la ciudad de Puebla, México.

5.2 Objetivos específicos

Aislar e identificar hongos fitopatógenos asociados a la pudrición del fruto de la fresa por técnicas microbiológicas y moleculares.

Determinar el efecto inhibitorio *in situ* y *ex vivo* de la hernandulcina sobre los hongos fitopatógenos.

Determinar los cambios bioquímicos asociados a la calidad del fruto durante la infección por los hongos fitopatógenos aislados y el efecto protector de la hernandulcina sobre dichos parámetros.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material vegetal

Las fresas, del cultivar Camino Real (Figura 12), se obtuvieron de un productor de Atlixco, Puebla, México (18.9082° N 98.4361° O).



Figura 12. Fresas. Las fresas utilizadas para el estudio fueron del cultivar Camino Real. Fuente: elaboración propia.

6.2 Cámara húmeda

Los frutos fueron colocados en contenedores herméticos previamente desinfectados. Se colocaron algodones húmedos impregnados con agua estéril (Figura 13). Los frutos permanecieron fuera de la exposición al sol y en la cámara durante tres días.



Figura 13. Fresas colocadas en cámara húmeda. Fuente: elaboración propia.

6.3 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación del Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) se requirieron los siguientes componentes en la concentración indicada. Por cada litro de agua: caldo proveniente de 200 g de papa hervida, 20 g de glucosa anhidra y 16 g de agar bacteriológico. El medio Caldo Papa Dextrosa (PDB por sus siglas en inglés) se preparó con los mismos ingredientes a las mismas concentraciones a diferencia que en este no se utilizó agar, o ningún gelificante. Ambos fueron esterilizados (121° C a 1 atm por 15 minutos) tras su elaboración. El medio se vertió en placas Petri estériles de 9 cm de diámetro.

6.4 Aislamiento y purificación de hongos en medio de cultivo

Una vez concluido el tiempo de incubación en cámara húmeda, el tejido fúngico fue aislado y purificado en placas Petri con PDA para la obtención de cultivos axénicos. La purificación se llevó a cabo según la morfología de los hongos, separando aquellos que mostraron un aspecto diferente entre ellos. Tras obtener los cultivos puros de hongos, estos se inocularon en frutos sanos para la evaluación de patogenicidad por medio de pruebas de Koch.

6.5 Pruebas de patogenicidad

Los frutos de fresa con apariencia sana fueron seleccionados y sumergidos durante 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 20% y enjuagados con agua destilada para ser lavados eliminando impurezas, contaminantes y otros microorganismos. El proceso siguiente fue lavar nuevamente los frutos con agua destilada estéril bajo condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. Posteriormente se secaron y fueron colocados en recipientes plásticos previamente desinfectados y etiquetados según los grupos seleccionados. Asegurando un grupo control de fresas sanas y asintomáticas, además de la preparación de fresas para la inoculación de los posibles hongos patógenos. El proceso de inoculación de las fresas utilizando hongos se llevó a cabo por inoculación de 100 conidios de los patógenos candidatos, siguiendo la metodología de Cóyotl-Pérez *et al.* (2022). El conteo de conidios fue realizado por medio de una cámara Neubauer. Se utilizó una punta de micropipeta estéril y penetró levemente la piel de las fresas inoculando con la solución de esporas. Tras la inoculación, las muestras fueron almacenadas durante tres días en condiciones de oscuridad, con un monitoreo diario bajo condiciones de asepsia. Las pruebas se confirmaron por la aparición de síntomas de infección. Es decir, presencia de pudrición y

emergencia de micelio aéreo. Los organismos fúngicos que infectaron al tejido vegetal fueron reaislados y sujetos a pruebas de microscopía para la visualización de su morfología y pruebas de biología molecular para su identificación.

6.6 Caracterización morfológica

La observación de la morfología microscópica de las estructuras reproductivas de los hongos fitopatógenos se llevó a cabo en un Microscopio Óptico Karl Zeiss Scope A1. Previamente se realizaron microcultivos (Figura 14) usando PDA. El medio fue seccionado por cubos de 1 cm x 1 cm por la parte exterior de la placa para después ser cortados con bisturí en condiciones de esterilidad. Haciendo uso de una placa Petri de vidrio de 100 mm x 15 mm la cual contenía una gasa hidratada con agua destilada estéril, se colocaron dos hisopos previamente esterilizados (Figura 14). Tal estructura sirvió de base para colocar un portaobjetos de vidrio que era soporte del cuadro de agar seleccionado. El cuadro seccionado de PDA se inoculó por punción con un asa de punta a los 4 lados. Sobre este se colocó un nuevo cubreobjetos de vidrio y se selló la placa. Esta se incubó durante 8 días a 25°C en presencia de luz.

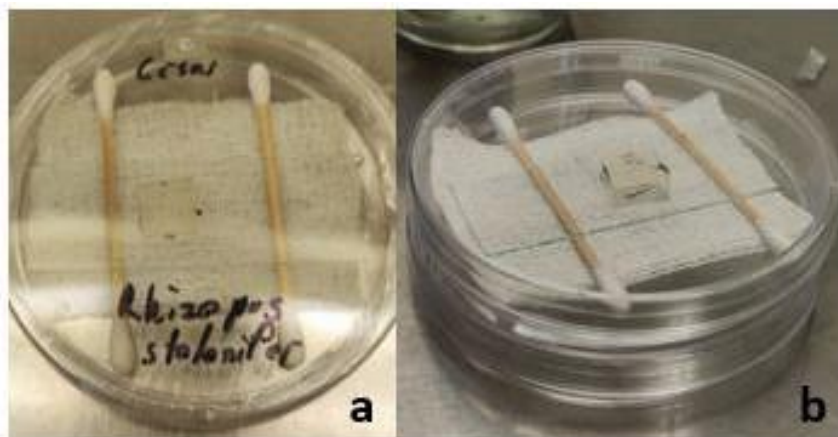


Figura 14. Ejemplo de microcultivo. a) Vista sobre el microcultivo y b) vista lateral. Fuente: elaboración propia

Se realizó un microcultivo para cada hongo aislado para poder visualizar sus estructuras. Posteriormente se utilizó un microscopio binocular acoplado a una computadora para una mejor captura de imágenes (Figura 15). Tras obtener las imágenes se prosiguió con una descripción de las estructuras de los hongos.



Figura 15. Microscopio Óptico Karl Zeiss Scope A1. Se muestra el microscopio utilizado para obtener una mejor visualización de los microcultivos. Fuente: elaboración propia.

6.7 Pruebas de identificación molecular

Este procedimiento se llevó a cabo comenzando por la extracción de ADN de los hongos seleccionados, el cual se extrajo con el uso del kit E.Z.N.A.® PLANT DNA DS de Omega siguiendo las instrucciones dictadas por el proveedor. La base del procedimiento de secuenciación consistió en amplificar la secuencia de regiones espaciadoras de transcritos internos (ITS por sus siglas en inglés) con el uso de los oligonucleótidos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), así como por amplificación de las regiones codificadoras de la proteína beta-tubulina Bt1a (TTCCCCGTCTCCACTTCTTCATG) y Bt1b (GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC). Las condiciones de amplificación por PCR fueron basadas en información previamente reportada (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022). La secuenciación de los amplicones se llevó a cabo por la compañía Macrogen ubicada en Seúl, Corea del Sur. Los resultados de la secuenciación se compararon con aquellas secuencias ya registradas en la base de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la ejecución de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool por sus siglas en inglés) con los parámetros predeterminados del programa. Las secuencias de ITS 1-4 también fueron editadas y ensambladas utilizando el programa BioEdit 5.0.9. y realizando el árbol filogenético con el software MEGA 7 y 11,

comparando con 19 secuencias más obtenidas de la base de datos del NCBI.

6.8 Pruebas de inhibición por microdilución en placa

Para esta prueba se realizaron microdiluciones con el fin de obtener una curva dosis-respuesta para definir las concentraciones de HE que se utilizaron para el tratamiento. Se utilizó una placa de 96 micropozos con capacidad de 300 μL por cada pozo. Se agregó un pozo control positivo agregando PDB, solución de esporas del hongo y resazurina. En cual debería de cambiar de color para indicar que el organismo es viable, esta reacción nos permite señalar la concentración mínima inhibitoria (CMI o MIC en inglés). A cada pozo se le añadió medio PDB (al menos 270 μL por pozo o el necesario para aforar a 300 μg) y una concentración de 100 esporas del respectivo hongo. Se utilizaron 10 μL de resazurina por cada pozo. En los pozos con tratamiento de HE se ajustó para que la concentración final en pozo fuera de 10, 20, 40, 50, 70, 80, 90, 100, 120 y 160 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de HE en el respectivo pozo contra *B. cinerea*. Las concentraciones fueron de 10, 20, 30, 40, 50, 80, 110, 200, 250 y 300 $\mu\text{g} / \text{mL}$ el caso de las pruebas contra *R. stolonifer*. La placa se cubrió con papel aluminio para su protección y para evitar su contaminación, posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas.

6.9 Aplicación de la hernandulcina en frutos de fresa

La HE fue donada por el M. en C. Carlos Jonnathan Castro Juárez, estudiante de doctorado del Centro de investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Nemesio Villa Ruano. La HE fue resuspendida en etanol al 20% para preparar las soluciones a las concentraciones necesarias para ser aplicadas a cada tratamiento. Esto permitió identificar si las CMI obtenidas *in vitro* eran efectivas en su aplicación *ex vivo*, es decir, en la aplicación en el fruto (Villa-Ruano *et al.*, 2021).

La distribución de los grupos se realizó de la siguiente manera. Un grupo control positivo, llamado Fresas Infectadas, inoculado con el respectivo hongo y sin ningún tratamiento. Un grupo control negativo, fresas Sanas, sin ser inoculado y sin ningún tratamiento. Un grupo con un control tratado con el agroquímico benomilo (300 $\mu\text{g} / \text{mL}$) usado como fungicida convencional. Un grupo tratado con HE a una concentración de 100 mg / L , nombrado HE 100. Un grupo tratado con HE a una concentración de 150 mg / L , nombrado HE 150. Un

grupo tratado con HE a una concentración de 250 mg / L, nombrado HE 250. Quince frutos de fresa (n=15) fueron contemplados para cada tratamiento. Los frutos fueron inoculados con 1000 conidias de cada hongo, las cuales fueron estimadas usando un hemocitómetro. El experimento inició tras la inoculación de los respectivos hongos en los frutos seleccionados (Día 0). Los registros del experimento comenzaron en el Día 1. El seguimiento fue hecho diariamente durante un periodo de 12 días. Para cada hongo evaluado se formaron estos grupos con control y tratamiento, a excepción del grupo HE 250, que sólo se agregó en el tratamiento contra *R. stolonifer*. La severidad de cada infección fue determinada cualitativamente por la presencia de síntomas o signos de infección en los frutos infectados, tales como pérdida de turgencia en la zona de inoculación, o emergencia de micelio en la zona de inoculación (o ambos).

Las soluciones madre constaron de HE preparada a 100, 150 y 250 mg / L. Con un aspersor se rociaron 300 mL de la solución de HE sobre cada respectivo tratamiento. La solución de HE fue aplicada cada 48 horas a la misma hora del día bajo condiciones de esterilidad, es decir, hasta 7 aplicaciones para el tratamiento más largo de 12 días hasta alcanzar el goteo. Las fresas del grupo control tratado con el fungicida químico benomilo, fueron rociadas también con benomilo hasta alcanzar el goteo (300 mg/L). Es decir, con una dosis más alta, pero con la misma frecuencia y en mismas condiciones que los grupos tratados con HE.

6.10 Evaluación de la firmeza

La evaluación de la firmeza de los frutos se llevó a cabo con un penetrómetro NEWTRY GY-3 (Huizhou, Cantón, China) con rango: 0,5 a 12 kg/cm con resolución de 0,1 kg/mm y 0,2 kg/cm de profundidad del cabezal de prensa. Se registró el promedio de cinco mediciones realizadas a un mismo individuo y posteriormente las mediciones fueron transformadas y reportadas a Newtons (N).

6.11 Análisis bromatológico

Los resultados de los experimentos con los grupos evaluados se obtuvieron mediante análisis bromatológicos. Tales análisis se llevarán a cabo según la metodología indicada por la Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Método 920.23 (proteína), método 945.66 (azúcares reductores), método 962.09 (fibra), método 920.39 (grasa). Se molió 1

gramo de materia vegetal y los fenoles y antioxidantes se extrajeron en acetona acuosa (70%), se determinó el contenido de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico mg/100g y la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox de acuerdo con la metodología de Pacheco-Hernández *et al.* (2023).

6.12 Extracción y cuantificación de antocianinas

Para la identificación de las antocianinas dos fresas fueron molidas, mezcladas y homogeneizadas en un mortero, a la pasta resultante se le agregó prontamente 20 mL de acetona acidificada con 0.01% de HCl. El producto se incubó en la oscuridad durante 12 horas y en frío a 4°C. El resultante filtró con papel Whatman No. 1 para posteriormente particionarse en 250 mL de solvente cloroformo. Tras su separación, se conservó la fase acuosa que posteriormente se concentró y se resuspendió en 100 µL de metanol acidificado con HCl (0.01%). La muestra se filtró con membrana de 0.45 µm y se resguardaron a 80°C hasta su análisis en HPLC-UV/MS. Para el análisis cromatográfico se empleó un equipo Agilent 1100 ejecuta las pruebas de HPLC, a las cuales se le acoplaron los equipos para HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/M, disponibles en el Cinvestav, Unidad Irapuato. Este equipo contiene adicionalmente un detector de matriz de diodos y está acoplado a un espectrómetro de masas Waters-Micromass. Para correr las muestras se usó una columna Zorbax C18 y se utilizaron las condiciones especificadas por de Rosso y Mercadante (2007). Tras la obtención del concentrado de antocianinas de la fresa y su posterior separación de los picos mayoritarios mediante HPLC estas muestras fueron con el objetivo de elaborar curvas de calibración para poder cuantificarlas (de Rosso y Mercadante, 2007).

6.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluaron para asegurar su distribución normal mediante el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.1. Posteriormente se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un factor comparando el control de Fresas Sanas respecto a los grupos de Fresas Infeccionadas y los tratamientos aplicados. Los análisis se complementaron con pruebas de Tukey con una $p < 0.05$ para identificar resultados estadísticamente significativos y con $p < 0.01$ para resultados altamente significativos. Estas pruebas estadísticas también fueron realizadas con GraphPad Prism 8.0.1.

7. RESULTADOS

7.1 Hongos fitopatógenos identificados y pruebas de patogenicidad

Del aislamiento de los hongos que afectaron a la fresa en la cámara húmeda se obtuvieron tres candidatos que fueron denominados C1, C2 y C3. Estos fueron mantenidos en medio PDA para obtener cultivos monospóricos. Los tres organismos fúngicos fueron sometidos a pruebas de patogenicidad para comprobar los postulados de Koch. De estos aislados solo C2 y C3 tuvieron la capacidad de generar síntomas de pudrición blanda causando degradación del tejido vegetal a través del tiempo como se observa en la Figura 16.

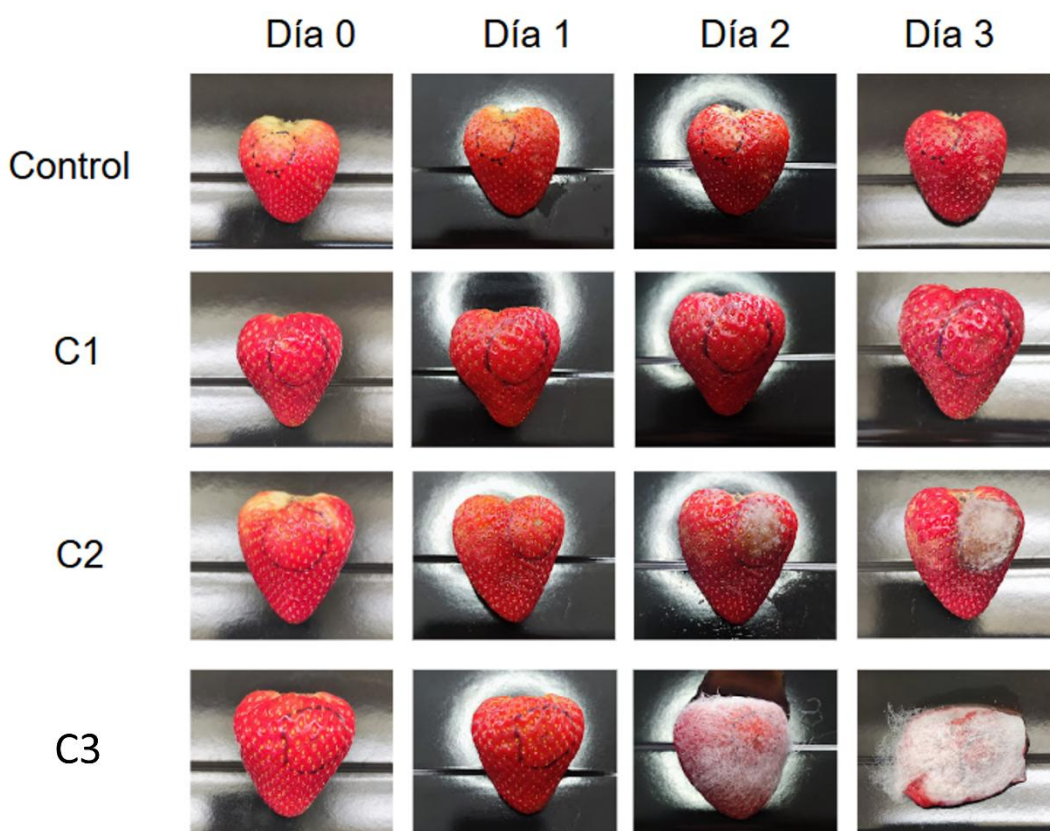


Figura 16. Pruebas de patogenicidad. En la imagen se pueden observar el monitoreo de cuatro grupos de fresas durante tres días. Al día tres se pudo observar el daño causado tras la infección por los candidatos a hongos fitopatógenos, siendo C2 y C3 los agentes que más afectaciones produjeron.

Como se observa en la Figura 16, los experimentos de patogenicidad constaron de cuatro grupos, siendo el grupo control fresas sanas sin ningún tipo de inoculación. Por otro lado, C1 refiere al grupo inoculado con el primer hongo aislado, C2 al grupo con el segundo hongo aislado y C3 con el tercero. Este último hongo fue más agresivo, por la rapidez y los daños

causados sobre el fruto de fresa en comparación con los demás. El grupo control mantuvo sus características físicas cualitativas sirviendo de referencia para comparar el daño causado por los hongos aislados. En el caso de las tres fresas inoculadas con el hongo C1 no se presentó daño o degradación del tejido por parte del patógeno durante el experimento. Los síntomas de pudrición causados por una visible infección por hongos aparecieron al día 2 tras la inoculación en las fresas del grupo C2 y C3. Se detectó la aparición de micelio, así como pérdida de turgencia al tacto y síntomas de pudrición. En los frutos del grupo C2 la aparición de una capa de apariencia ceniza sobre el área inoculada confirmó la infección por un fitopatógeno al día 2. Para el día 3, el área afectada era evidentemente más grande y con una biomasa de origen fúngico sobresaliente en la superficie. Para el grupo C3 la pérdida de turgencia se manifestó desde el día 1, mientras que para el día 2 la pérdida de turgencia y el desarrollo masivo de hifas aéreas confirmaron el ataque de un fitopatógeno. De manera inesperada para el día 3, las fresas del grupo C3 habían sido completamente invadidas por un micelio filamentosos color blanco, acompañadas de pérdida de firmeza. Tras esta evaluación se determinó que los aislados C2 y C3 poseyeron características de fitopatógenos poscosecha. Mediante una revisión visual preliminar se identificaron presuntamente como *Botrytis* spp. y *Rhizopus* spp. respectivamente.

7.2 Identificación morfológica y molecular

7.2.1 Identificación morfológica de C3

El aislado C3 presentó un crecimiento rápido (1-3 días) extendido por toda la superficie de la placa con medio PDA, a temperatura ambiente y en oscuridad (Figura 17). La colonia presentó en su anverso una coloración blanca con textura algodonosa, consistencia suave, forma filamentosos y con hifas aéreas de forma alargada (Figura 17a). La coloración al tercer día se tornó de color grisáceo con tendencia a verde por la presencia de esporangióforos que cubrieron casi por completo la superficie de la placa, incluso rebasando los bordes de la caja Petri (Figura 17a) y con crecimiento regular. En la parte del reverso (Figura 17b) la coloración fue blanca en el centro con bordes filamentosos y de color gris en los extremos.

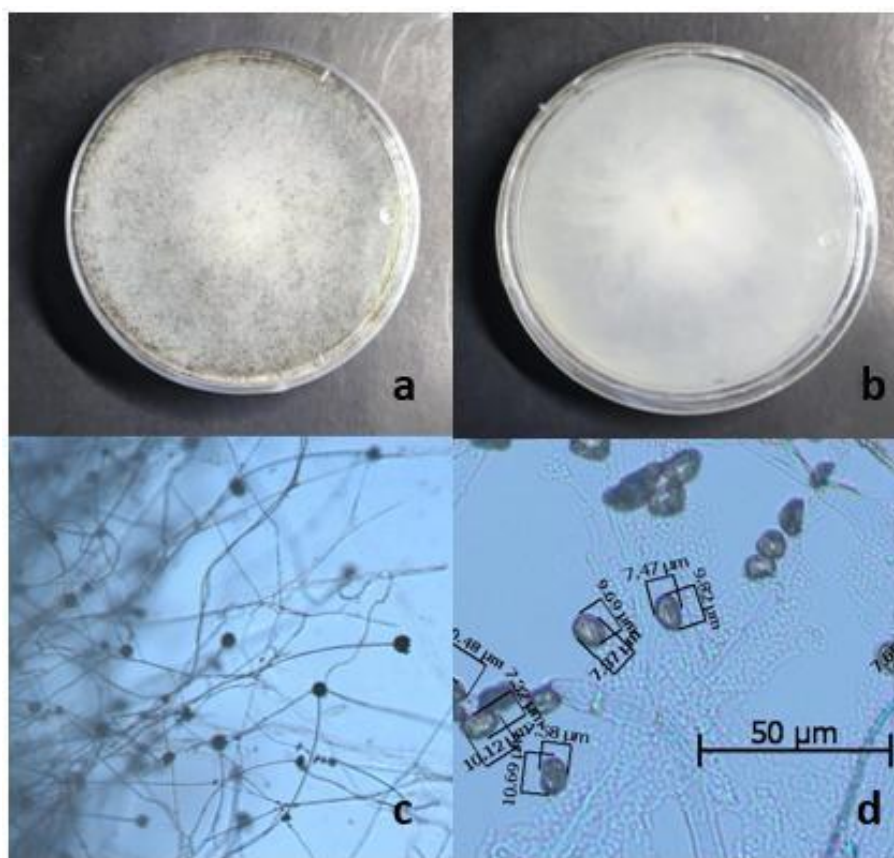


Figura 17. Hongo fitopatógeno C3 aislado de fresa en caja Petri en medio PDA. a) Morfología del hongo C3 preliminarmente identificado como *Rhizopus* spp. b) Vista del reverso de la caja Petri. c) Conidióforos con aumento de 10x. d) Conidios con aumento de 50x.

Bajo el microscopio óptico con un aumento 10x se observó la presencia de hifas erectas con ligeras torsiones sin ramificaciones (Figura 17 c). Las hifas terminales presentaron un solo esporangióforo de color verde oscuro, de los cuales emergieron conidios (c) que presentaron formas ovaladas y tamaños irregulares con un promedio de 7.54 µm de ancho x 11.56 µm de largo. Tal descripción coincide con la registrada por Bautista-Baños *et al.* (2014) con la descripción morfológica de *Rhizopus stolonifer*.

7.2.2 Identificación morfológica de C2

El crecimiento de C2 fue más lento que el de C3, ya que tardó más de 4 días en cubrir la placa Petri (Figura 18a) con medio PDA, a temperatura ambiente y en oscuridad. De los primeros días presentó una textura algodonosa y blanca con tendencia a gris, pasado el

tiempo, en algunas zonas se tornó gris oscuro. La colonia presentó consistencia suave, borde entero y forma circular. Posteriormente, tras 6 o 7 días comenzó la formación de esclerocios que presentaron pigmentación negra que se apreciaron mejor en el reverso de la placa (Figura 18b).

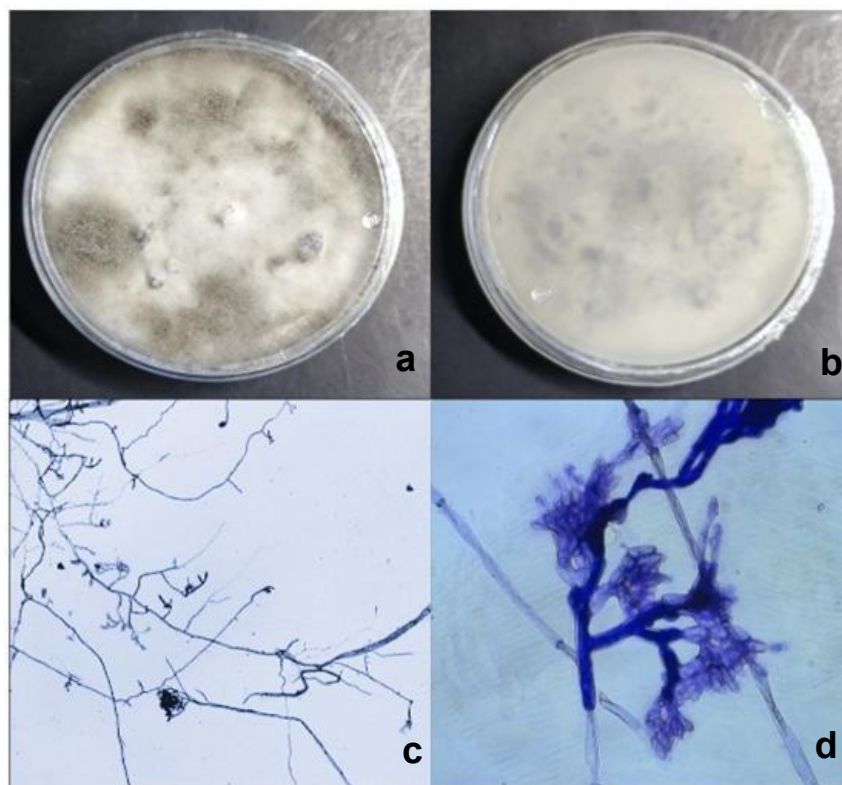


Figura 18. Hongo fitopatígeno C2 aislado de fresa en caja Petri conteniendo PDA. a) Morfología del hongo C3 preliminarmente identificado como *Botrytis* spp. b) Vista del reverso de la caja Petri. c) Muestra aumentada 10x. d) Conidios con aumento de 100x.

Bajo el microscopio, con aumento 10x, se observó la presencia de hifas hialinas y septadas (Figura 18c). Las terminaciones de las hifas presentaron ramificaciones, donde se encontraban esporangióforos (Figura 18d) con abundante presencia de conidios agrupados en forma de racimos y de un color más oscuro que las hifas. Esta descripción coincide con aquella reportada por Montiel-Frausto y Vázquez-López (2023) correspondiente a *Botrytis cinerea*.

7.2.3 Identificación molecular de C3

La secuencia del gen de la beta-tubulina fue alineada en la base de datos del NCBI y resultó tener alrededor del 97 % de identidad con otras de *Rhizopus stolonifer* de acuerdo con su comparación con aquellas depositadas en la base de datos (Figura 19). Por otro lado, la secuencia de espaciador transcrito interno del gen ribosomal (ITS 1-4) 18S tuvo un porcentaje de identidad máximo de 95.97 % con ON209121.1 y otras de las secuencias como AB113023.1 y FN401529.1 registradas en la base de datos para *Rhizopus stolonifer* (Figura 19).

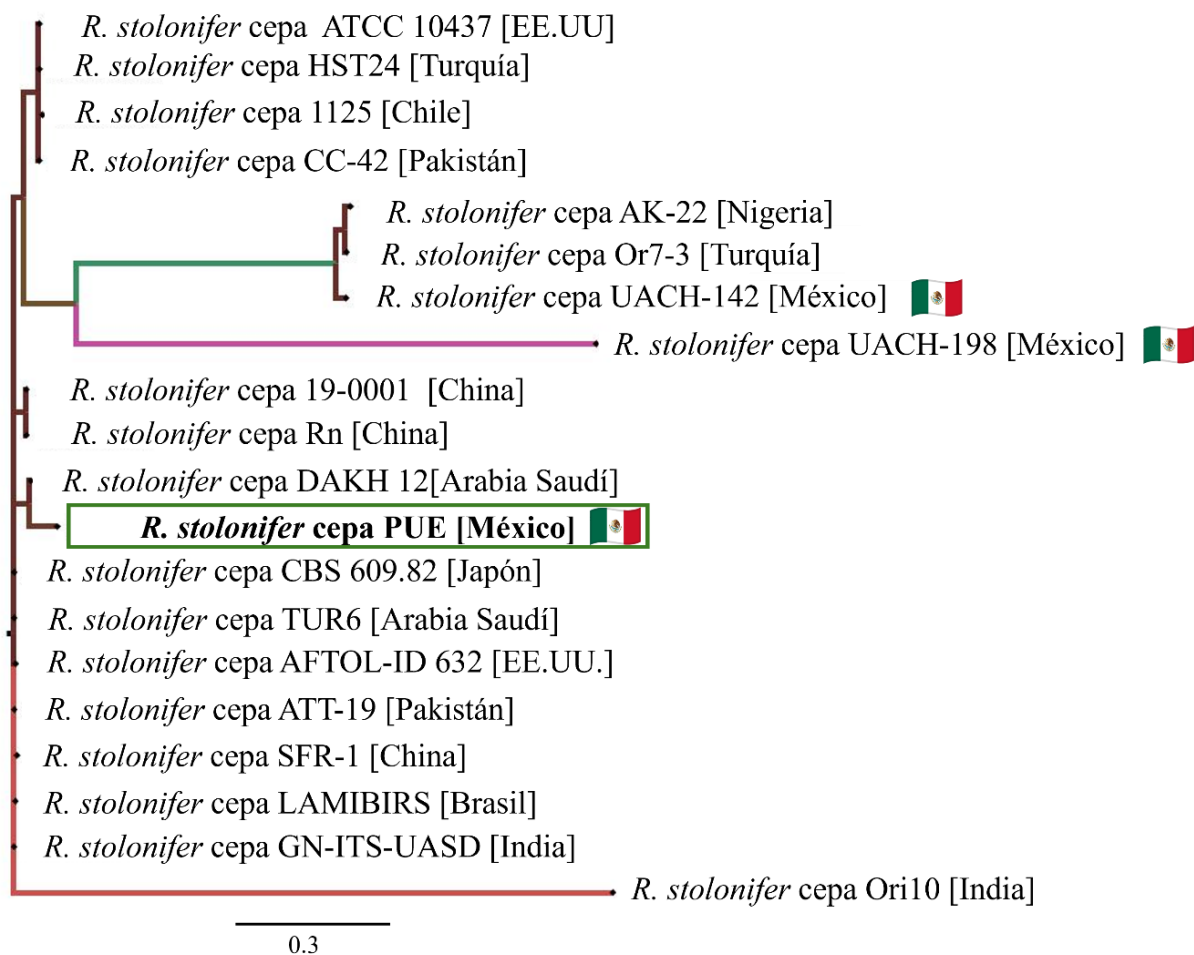


Figura 19. Árbol filogenético generado por el método de vecindad a partir de secuencias de la región ITS 1-4 del gen ribosomal 5.8S. Se utilizó un modelo HK+Y para determinar divergencia entre las cepas. La cepa PUE de *R. stolonifer* utilizada en este estudio se resalta en negritas. Resaltan las cepas reportadas en México con una bandera del país.

En los alineamientos múltiples, el término “Query cover” indica el porcentaje de la secuencia que fue cubierto durante el alineamiento, abarcando un 92% para beta tubulina y un 100% de cobertura para ITS. Estos datos confirmaron que el aislado C3 de fresa que se utilizó en este trabajo correspondió a *Rhizopus stolonifer*. Posteriormente ambas secuencias fueron subidas a la base de datos del NCBI. La secuencia de ITS de *R. stolonifer* con el número de acceso del GenBank: PP999471. La secuencia de ITS de *B. cinerea* con el número de acceso del GenBank: PP993506.1

7.2.4 Identificación molecular de C2

Los resultados de la secuenciación del hongo C2 reveló que el ITS 1-4 tuvo un porcentaje de identidad del 99.09% con las secuencias JX840481.1, KF802809.1 y JX875916.1 entre muchas otras, algunas de ellas registradas con la identidad de *Botrytionea fuckeliona*, que es un telomorfo de *Botrytis cinerea*. Mientras que el análisis de la secuencia del gen de la beta-tubulina arrojó un porcentaje de identidad de 99.37% para *Botrytis cinerea*. Con esta evidencia se comprobó la identidad de C2 como *Botrytis cinerea*. Además, el árbol filogenético corrobora la cercanía con otras cepas de la misma especie, brindando un bosquejo de la distribución de este organismo (Figura 20).

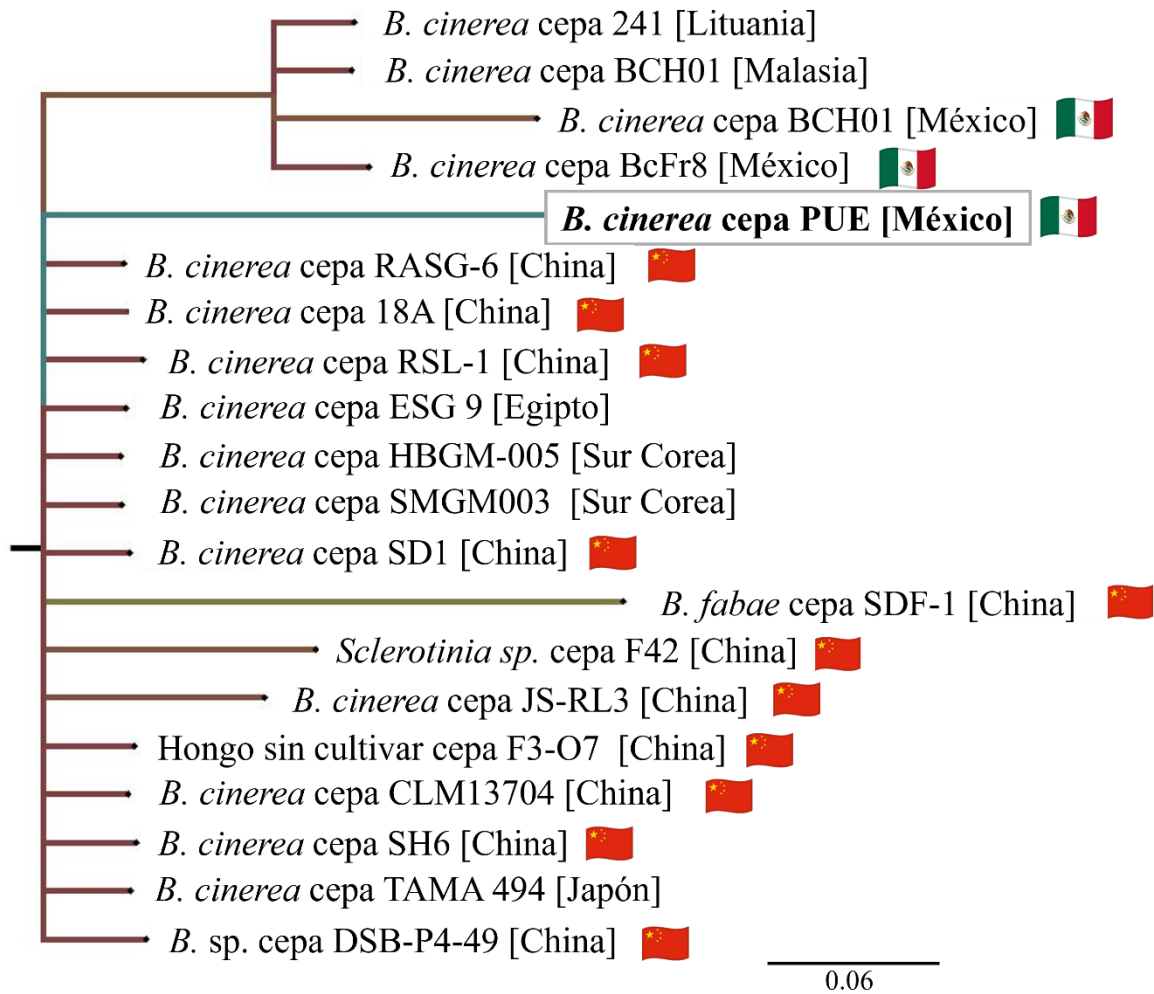


Figura 20. Árbol filogenético generado por el método de vecindad a partir de secuencias del gen codificante para beta tubulina. Se utilizó un modelo F81+I para determinar divergencia entre las cepas. La cepa PUE de *B. cinerea* utilizada en este estudio se resalta en negritas.

Resaltan las cepas reportadas en México y China con la respectiva bandera del país.

En este árbol resalta la abundancia de cepas con origen en China, en general en Asia. Las cepas utilizadas fueron las más cercanas en cuanto homología resultantes de un alineamiento múltiple. Esto podría sugerir una posible traza de la distribución de este organismo.

7.3 Pruebas de inhibición por microdilución en placa

Esta prueba tuvo dos fines, el primero fue determinar si la HE era capaz de inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos aislados y el segundo determinar la concentración

mínima inhibitoria (MIC) que se usaría para las pruebas siguientes. Gracias a la prueba en micropozos utilizando resazurina como indicador de viabilidad celular se logró registrar el efecto inhibitorio de la hernandulcina sobre la viabilidad celular de *R. stolonifer* y *B. cinerea* bajo condiciones *in vitro*. Para estas pruebas se realizaron disoluciones de HE a distintas concentraciones en el orden de microgramos por mililitro para cada hongo. Estas concentraciones fueron asignadas de manera específica de acuerdo con la agresividad de cada hongo. Para *Botrytis cinerea* se asignaron las concentraciones de 10 a 160 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para *Rhizopus stolonifer* se asignaron las concentraciones de 10 a 300 $\mu\text{g/mL}$. En el ensayo mostrado en la Figura 21, se muestra que las concentraciones 10 a 90 $\mu\text{g/mL}$ no mostraron ser capaces de combatir el crecimiento de *B. cinerea* al verse un cambio colorimétrico producido por la resazurina, de azul a amarillo-naranja. Por lo tanto, se decidió utilizar la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ ya que esta sí fue capaz de inhibir el crecimiento al no haber un cambio colorimétrico detectable. Para el ensayo *in vivo* en fresas se decidió utilizar las concentraciones de 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$ por encontrarse en el rango de las diluciones efectivas para combatir al hongo.

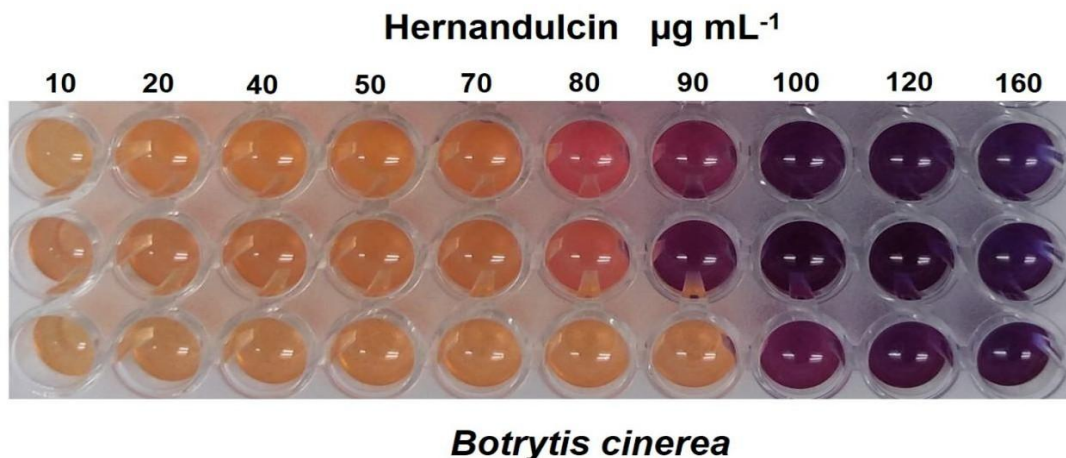


Figura 21. Resultados de las pruebas por triplicado de disoluciones de HE contra *B. cinerea* utilizando resazurina como indicador colorimétrico de viabilidad celular.

Por otro lado, en las pruebas mostradas en la Figura 22, las concentraciones menores a 80 $\mu\text{g/mL}$ no mostraron ser rotundas para evitar el crecimiento del hongo al mostrar cambios colorimétricos en la prueba. Por lo que se decidió utilizar concentraciones a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ las pruebas en fresas. Las concentraciones elegidas para las pruebas *ex vivo* fueron de 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$, como en la prueba anterior. No obstante, para la evaluación *ex vivo* se

añadió la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$, debido a la capacidad y la velocidad de *R. stolonifer* para atacar el fruto de la fresa.

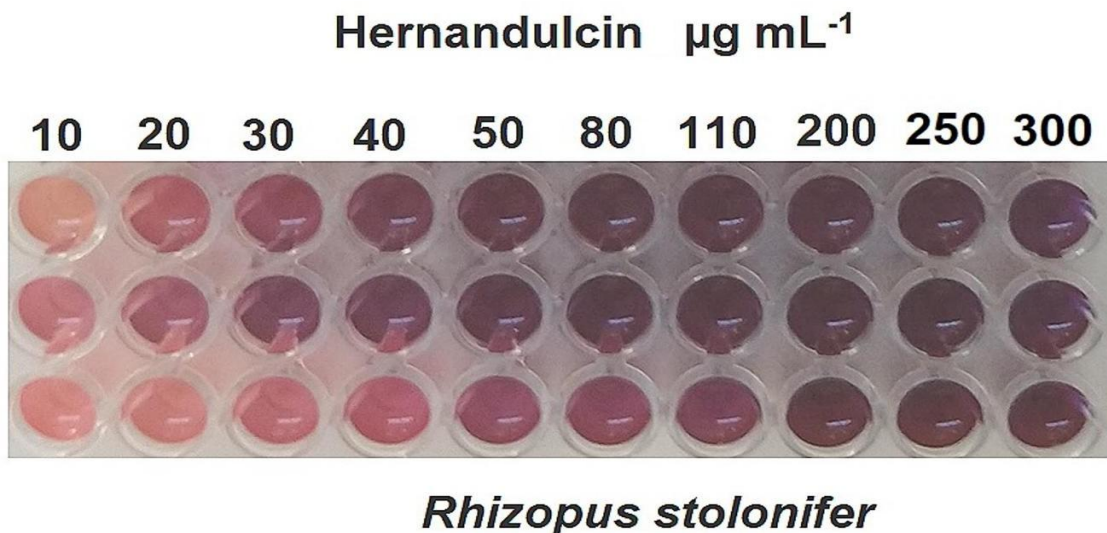


Figura 22. Resultados de las pruebas por triplicado de disoluciones de HE contra *R. stolonifer* utilizando resazurina como indicador colorimétrico de viabilidad celular.

En la Figura 23 se puede observar la inhibición del crecimiento *in vitro* de acuerdo con la concentración a la que fue aplicada la HE. Esta grafica permite ilustrar de mejor manera el efecto y el rango de las concentraciones que se utilizaron para los siguientes experimentos.

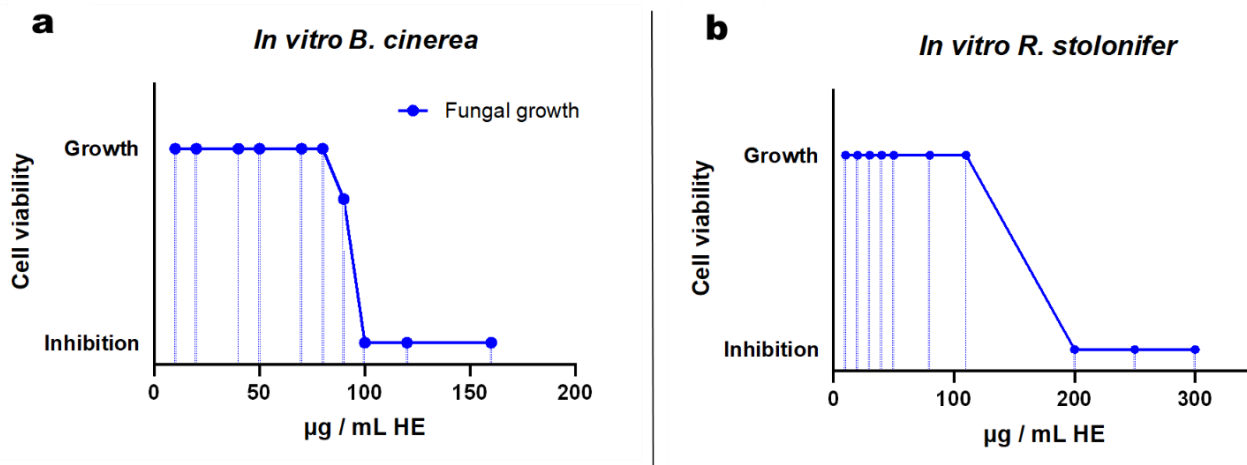


Figura 23. Resultados de las pruebas de inhibición *in vitro* contra a) *B. cinerea* y contra b) *R. stolonifer*. La caída en la línea azul indica el rango en que se encuentra la CMI.

La línea azul representa el metabolismo activo del hongo. Cuando la concentración de HE no basta para inhibir el crecimiento la línea se mantiene arriba, en crecimiento. En cambio, cuando la concentración de HE empieza a ser efectiva se nota el declive en la línea azul, lo que indica el paro en la actividad metabólica del hongo. El declive de esta línea muestra el rango en que se encuentra la CMI en la evaluación *in vitro*. Contra *B. cinerea* a partir de 100 µg/mL mientras que contra *R. stolonifer* comienza a 200 µg/mL.

7.4.1 Efecto protector de la hernandulcina en fresa inoculada con *Botrytis cinerea*

Durante 8 días, el grupo de Fresas Sanas no presentó síntomas de infección por hongos, mientras que aquellas inoculadas con 100 conidios de *B. cinerea*, desarrollaron síntomas de infección evidentes (Figura 24). El grupo de fresas tratadas con benomilo a una concentración de 300 mg/L no detuvo el crecimiento del hongo en el fruto, sin embargo, las fresas tratadas con HE lograron retrasar el crecimiento de ambos hongos por un periodo de 8 días. El tratamiento más efectivo fue de 150 mg/L.

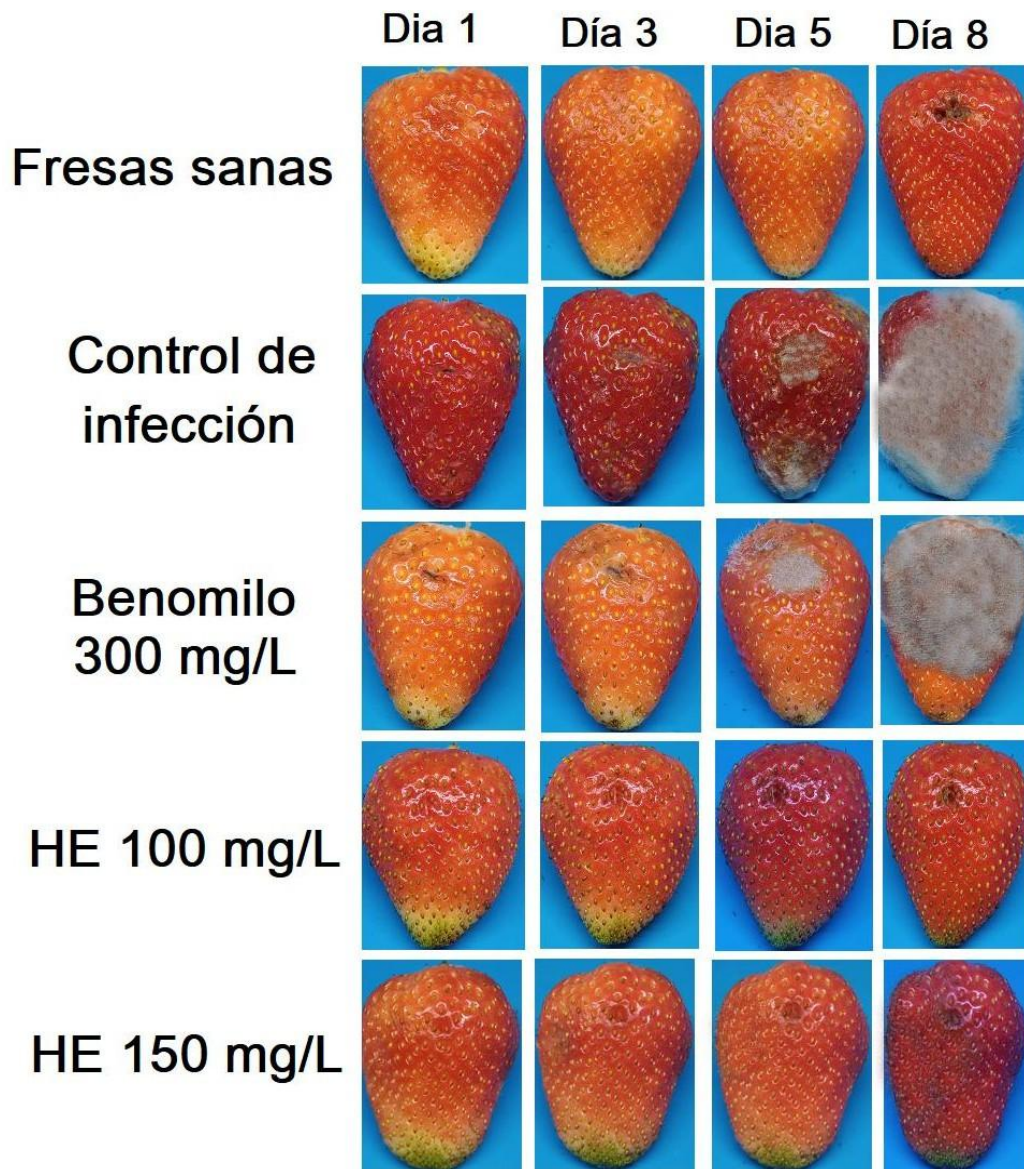


Figura 24. Efecto de la aplicación de hernandulcina (HE) sobre el crecimiento de *B. cinerea* en condiciones *ex vivo*.

Durante los 8 días de observación se mostraron evidentes contrastes en el desarrollo de la infección y con los frutos que no fueron afectados. Al día 5, las fresas infectadas y el aquellas tratadas con benomilo mostraron signos de infección por *B. cinerea*. Una clara infección sistémica se observó al día 8 en ambos grupos. Esto corroboró que el Benomilo tuvo un efecto nulo sobre el crecimiento del hongo. La apariencia de las fresas tratadas con HE fue muy similar a aquella de las fresas sanas. Tal resultado demostró un claro efecto protector de la HE a ambas concentraciones evaluadas contra *B. cinerea*.

7.4.2 Efecto protector de la hernandulcina en fresa inoculada con *Rhizopus stolonifer*

Como ya se había observado anteriormente, la infección por este hongo fue más agresiva que la ocasionada por *B. cinerea* en términos de velocidad de crecimiento y daño al fruto. Debido a la agresividad del hongo los tratamientos y la observación se extendieron a 12 días en este caso (Figura 25).

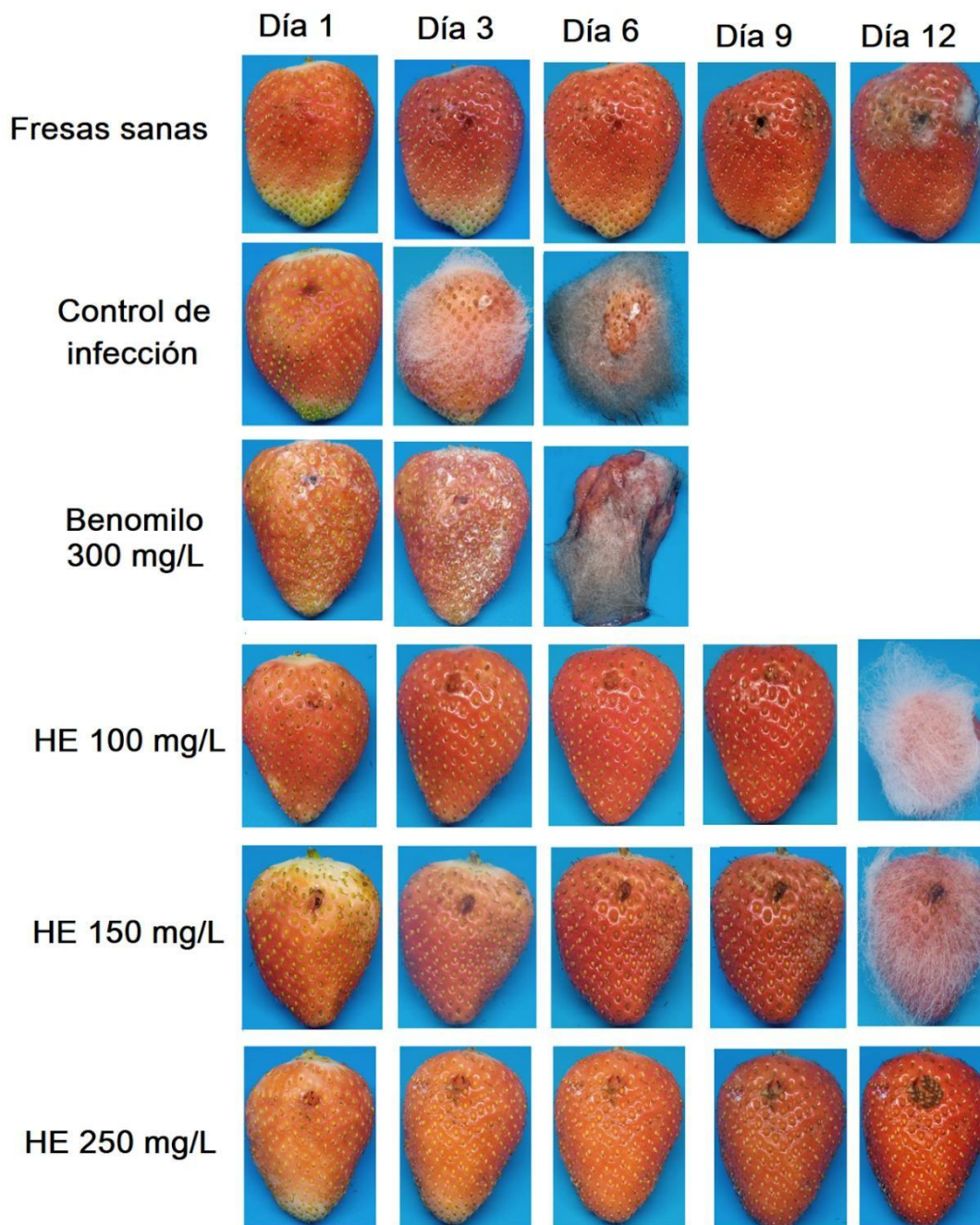


Figura 25. Efecto de la aplicación de la hernandulcina (HE) sobre el crecimiento de *R. stolonifer* en condiciones *ex vivo*.

El grupo de fresas sanas se mantuvo en buenas condiciones durante la evaluación, sin embargo, para el día 12, algunos frutos presentaron síntomas de infección. Esto probablemente debido a la presencia de esporas fúngicas en los aquenios del receptáculo de la fresa.

Como es sabido, estas pueden resistir al proceso de sanitización ya que la carga microbiana se disminuye, pero queda la posibilidad de que pocas esporas queden con vida. Por este motivo que algunas fresas consideradas sanas, desarrollan síntomas de infección conforme pasa el tiempo, otra posibilidad es por contaminación cruzada durante la manipulación.

Las fresas inoculadas con 100 conidios de *R. stolonifer* presentaron una emergencia rápida de micelio, desde el día 3. Para el día 6, el fruto de fresa se observó con síntomas serios de infección y los tejidos totalmente desintegrados. En estos se visualizó por la aparición de estructuras reproductivas. Al igual que para *B. cinerea*, el benomilo no mostró capacidad inhibitoria sobre *R. stolonifer*, ya que la infección severa y pérdida de turgencia en fresas tratadas con este fungicida sintético, fueron similares a la de fresas infectadas sin tratamiento al día 6. En el caso del grupo tratado con 100 mg/L de HE, este mostró una apariencia sana hasta el día 9. No obstante, para el día 12 la infección por el agente patógeno fue visible debido a la proliferación de micelio aéreo. Un caso similar fue determinado para el grupo tratado con 150 mg/L de HE. Para este grupo la apariencia saludable fue mantenida hasta el día 9 pero para el día 12 la infección proliferó. Remarcablemente, el grupo tratado con 250 mg/L de HE mostró ser efectivo en apariencia contra el crecimiento del hongo hasta el día 12.

Como puede observarse en las dos figuras anteriores, las estructuras de los hongos poblaron la superficie de la fresa al mismo tiempo. Utilizando la proliferación del micelio fúngico respecto del tiempo utilizamos el término “agresividad” para referirnos a cuál de los dos hongos colonizó la superficie del huésped con mayor rapidez. Con esta definición se elaboró el siguiente gráfico para ilustrar cuál de los dos hongos fue más agresivo.

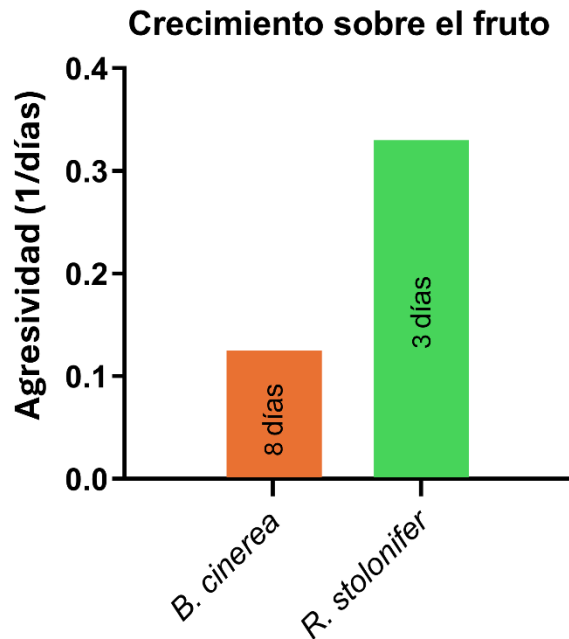


Figura 26. La agresividad se definió como $1 / \text{días}$ que cada hongo tardó en cubrir el 80 % de la superficie de la fresa. Así se guarda una relación de mayor agresividad igual a mayor longitud de la barra.

Para realizar la gráfica se utilizó la fórmula ($1 / \text{días}$ desde la inoculación que tardó el hongo el cubrir el 80 % de la superficie del fruto). Es decir, a *B. cinerea* le tomó 8 días en cubrir la superficie requerida, por lo tanto: $1 / 8 = 0.125$ como valor de agresividad asignado. Mientras tanto, a *R. stolonifer* le tomó sólo 3 días abarcar la misma superficie: $1 / 3 = 0.333$ como valor de agresividad. De esta manera se ilustra la alta velocidad de crecimiento de *R. stolonifer* respecto de *B. cinerea*.

7.5 Variación en la firmeza de fresas infectadas con *B. cinerea* y con *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

Un parámetro importante en la calidad de los frutos es la firmeza, por lo cual esta fue medida y analizada (Figura 27).

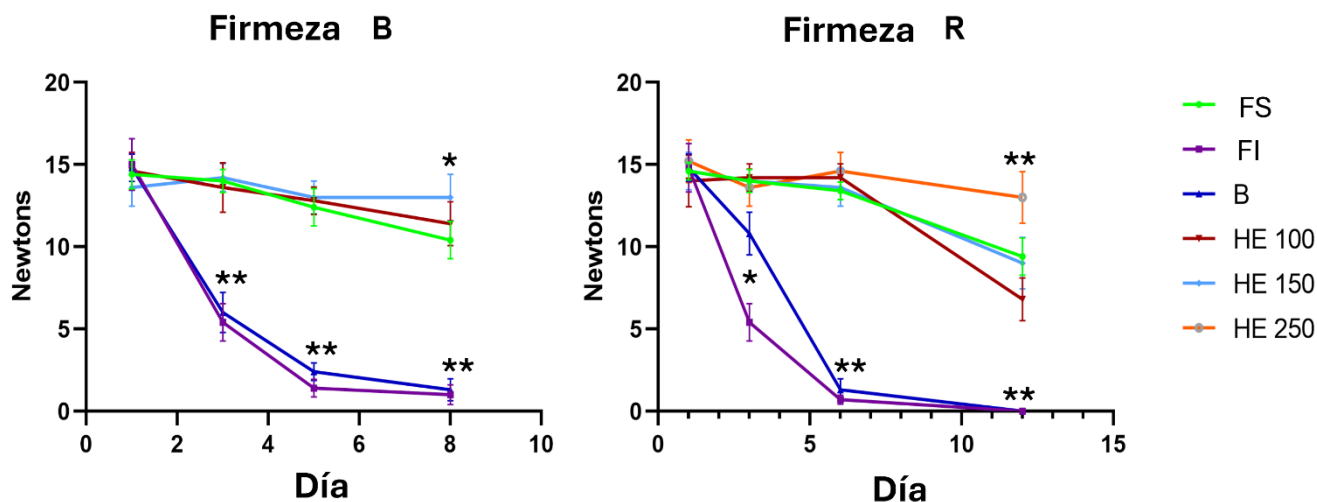


Figura 27. Gráficas de la firmeza en los grupos de fresas tratados con HE. a) Efecto de la HE sobre fresas infectadas con *B. cinerea*. b) Efecto de la HE sobre fresas infectadas con *R. stolonifer*. n=5, * indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) ** indica diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) y por ANOVA Tukey.

La firmeza de todos los grupos de fresas tuvo un promedio de 14.4 N al inicio del experimento (Figura 27). Al tercer día del experimento se notaron las diferencias estadísticamente significativas entre la firmeza del grupo de fresas sanas y tratadas con HE con respecto a los demás grupos. De acuerdo con el análisis estadístico, no se halló diferencia altamente significativa en la firmeza hasta el día 8 entre los grupos de fresas sanas y aquellas tratadas con hernandulcina ($p < 0.01$). Estos datos sugieren pocas o nulas diferencias entre las fresas infectadas y aquellas tratadas con benomilo. La firmeza de fresas infectadas y las tratadas con benomilo al día 8 no rebasó los 1.3 N. El grupo fresas sanas sufrió una pérdida gradual de firmeza al día 12 a 9.4 N. No existieron diferencias significativas entre los grupos fresas sanas y aquellas tratadas con hernandulcina a una concentración de 150 mg/L. Los niveles de firmeza en fresas sanas y hernandulcina (100, 150 y 250 mg/L) se mantuvieron sin diferencias significativas hasta el día 6. El grupo de fresas tratado con hernandulcina a una concentración de 100 mg/L decreció a 6.8 N al día 12, presentando diferencias significativas

contra los demás grupos ($p < 0.01$). El grupo de fresas tratados con hernandulcina a una concentración de 250 mg/L mantuvo su firmeza al día 12, en 13 N, presentando diferencias estadísticamente significativas contra todos los demás grupos ($p < 0.01$), incluso mejor firmeza que el grupo de fresas sanas. Los grupos de benomilo y de fresas infectadas tuvieron un valor de 0.0 N en el día 6.

7.6 Obtención y análisis de antocianinas

El análisis por HPLC acoplado a espectrometría de masas mostró la presencia de antocianinas en las fresas evaluadas. Gracias a esto se pudo observar la presencia de tres distintas, como se muestra en el cromatograma de la Figura 28.

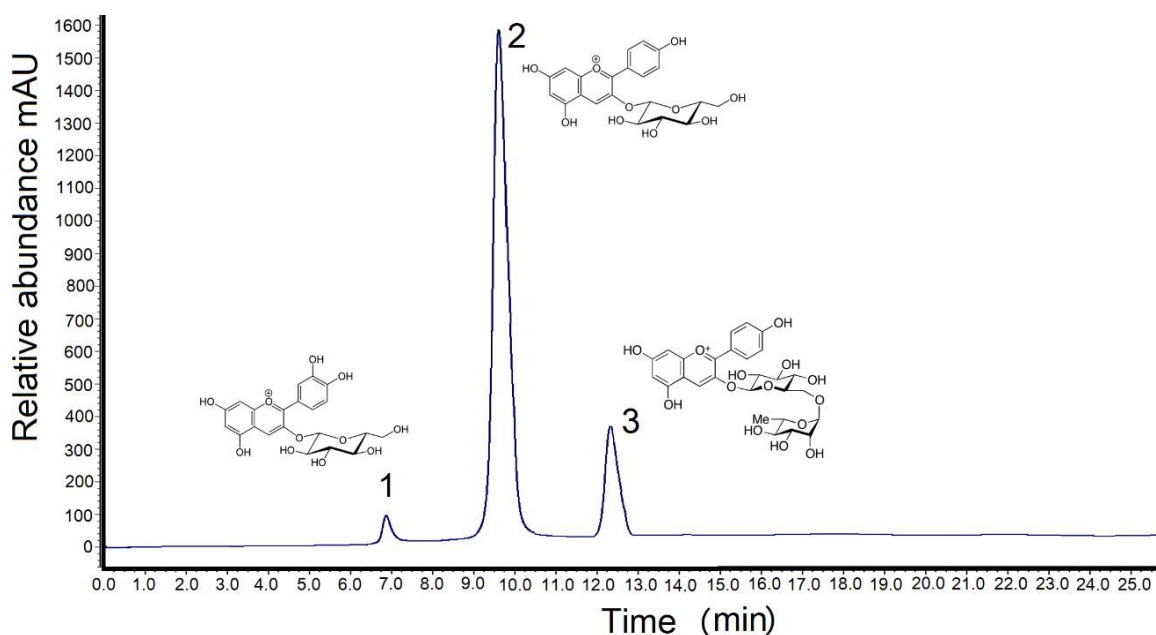


Figura 28. Resultados de la cromatografía HPLC-MS.

En la imagen se distinguen la separación de tres antocianinas identificadas como cianidina-3-O-glucósido (6.9 min), pelargonidina-3-O-glucósido (9.7 min) y pelargonidina-3-O-rutinósido (12.6 min). Posteriormente se les asignó una identidad gracias a la espectrometría y las medidas obtenidas durante la corrida.

Tabla 4. Características de la espectrometría de las antocianinas de fresa cv. Camino Real. El número de pico corresponde al perfil de elución de la Figura 28.

Pico	λ max (nm)	Compuesto	[M + H] ⁺ (m/z)	MS/MS
1	515	Cianidina-3-O-glucósido	449	287
2	502	Pelargonidina-3-O-glucósido	433	271
3	503	Pelargonidina-3-O-rutinósido	579	433, 271

Estas antocianinas fueron identificadas de acuerdo con su espectro de absorción UV en contraste con aquel obtenido por masas y masas/masas. El tamaño del área bajo la curva de cada pico es proporcional a la concentración de esta misma. De esta manera se identificó que la antocianina más abundante en las muestras fue la pelargonidina-3-O-glucósido (señal 2), la cual aparece entre el minuto 9 y 10, seguida en abundancia por la pelargonidina-3-O-rutinósido (señal 3) entre el minuto 12 y 13. En menor concentración se encontró la cianidina-3-O-glucósido (señal 1) ubicada aproximadamente en el minuto 7.

7.7 Contenido de nutrientes en fresas infectadas con *B. cinerea* tratadas con hernandulcina

El efecto de la hernandulcina sobre la conservación de proteína, grasa, fibra y azúcares reductores se muestra en la Figura 29.

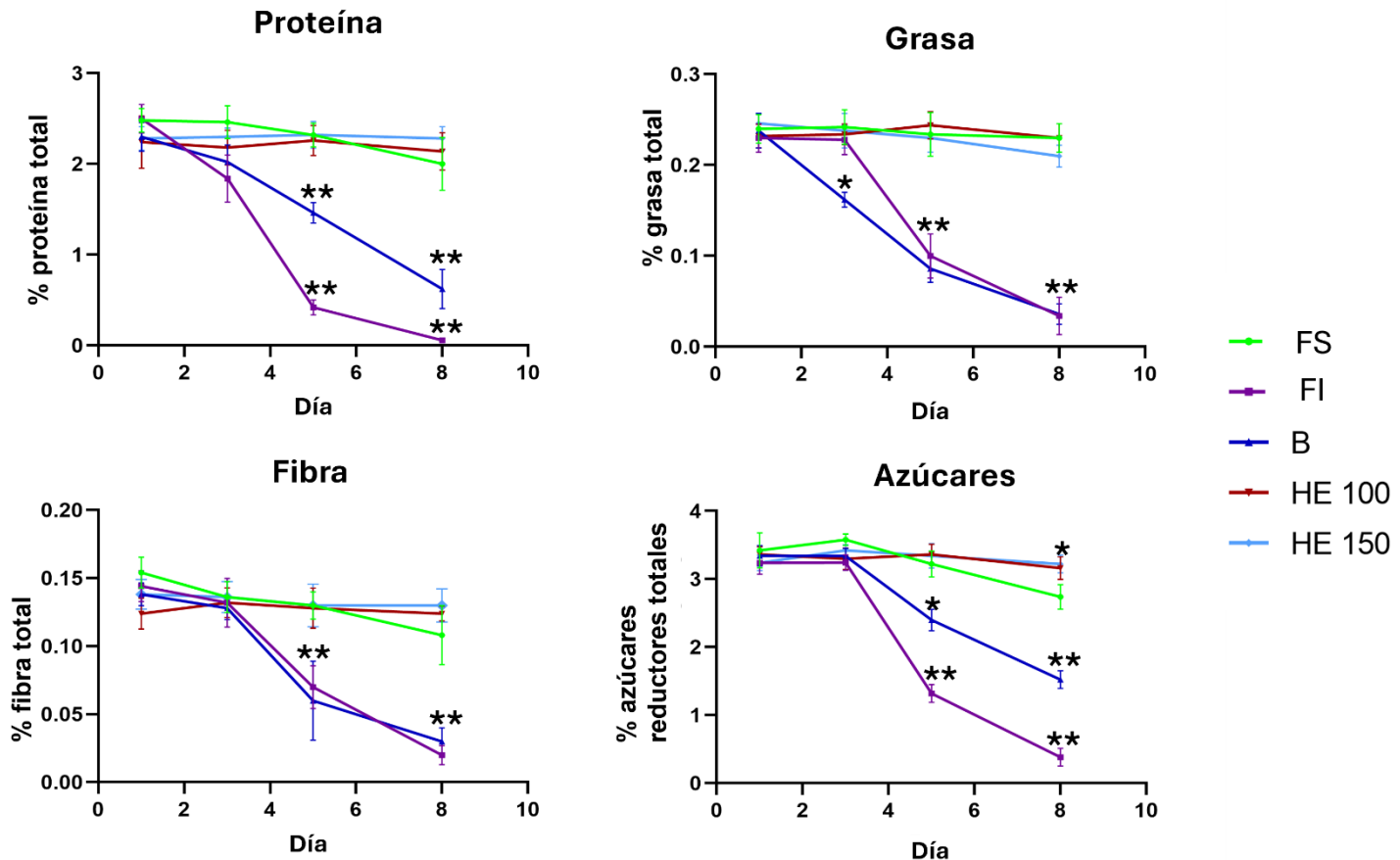


Figura 29. Contenido de proteína (a), grasa total (b), fibra total (c) y azúcares reductores (d) en fresas tratadas con hernandulcina (HE) e infectadas con *B. cinerea*. n=5. ** indica la presencia de diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$) por ANOVA - Tukey.

7.7.1 Variación de proteína total en fresas infectadas con *B. cinerea* tratadas con hernandulcina

La concentración inicial promedio de proteína en el fruto de fresa fue del 2.3% (Figura 30a). De acuerdo con el análisis estadístico no existió diferencia estadísticamente significativa en el contenido de proteína entre los grupos de fresas sanas y aquellas tratadas con hernandulcina ($p < 0.01$) durante el experimento. Se pudo distinguir que la tendencia de estos tres grupos fue similar en el tiempo con una ligera caída en fresas sanas. Por otra parte, se determinó una notoria pérdida en el contenido de proteína en el grupo de fresas tratado con benomilo desde el día 3 y una pérdida aún mayor en el grupo de fresas infectadas. Por lo tanto, durante los 8 días en los que se desarrolló el experimento, el tratamiento con HE mantuvo los niveles de proteínas de fresa.

7.7.2 Variación de grasa total en fresas infectadas con *B. cinerea* tratadas con hernandulcina

En la Figura 30b se muestra que el contenido de grasa total en los grupos de fresas sanas y las tratadas con HE (con ambas concentraciones) se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas durante 8 días. Lo que mostró la preservación del 0.23% de grasa total. Las fresas infectadas mostraron un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) respecto al grupo de fresas sanas en el contenido de grasa el día 5. En cuanto al grupo tratado con benomilo, este mostró una disminución en el porcentaje de grasa total (a 0.16%) desde el día 3 con diferencias significativas. Para el día 8, el contenido de ambos grupos se redujo a un 0.03%, cuando las fresas estaban en un avanzado grado de pudrición.

7.7.3 Variación de fibra total en fresas infectadas con *B. cinerea* tratadas con hernandulcina

Lo niveles de fibra en fresas sanas y las tratadas con HE se mantuvieron en un promedio de 0.13% sin diferencias significativas (Figura 29c) a lo largo del experimento. Se observó que en fresas sanas existió una ligera disminución en el contenido de fibra entre el día 1 y el día 8, mientras que en los grupos tratados con HE no existieron cambios sustanciales. Estos grupos presentaron diferencia estadísticamente significativa desde el día 5 respecto al grupo tratado con benomilo y al de fresas infectadas. Tanto fresas infectadas como las tratadas con benomilo disminuyeron a 0.03 % en el contenido de fibra para el día 8. Entre estos dos últimos grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas.

7.7.4 Variación de azúcares reductores en fresas infectadas con *B. cinerea* tratadas con hernandulcina

Las fresas tratadas con HE mantuvieron niveles estables de azúcares reductores, del 3.2%, del día 1 al día 8 sin mostrar diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 29d). Por otra parte, el grupo de fresas sanas mostró una reducción de los azúcares a 2.74 % para al día 8, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa entre fresas sanas y las tratadas con HE. Por lo tanto, el tratamiento con HE conservó los azúcares reductores de las fresas mejor que las fresas sanas sin ningún tratamiento. Con el tratamiento con benomilo los niveles decayeron en promedio al 0.5% para el día 8, mientras que el grupo de fresas infectadas decreció sus niveles de azúcares reductores a 0.38% en el mismo periodo.

7.8 Contenido de nutrientes en fresas infectadas con *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

El efecto de la hernandulcina sobre la conservación de proteína, grasa, fibra y azúcares reductores se muestra en la Figura 30.

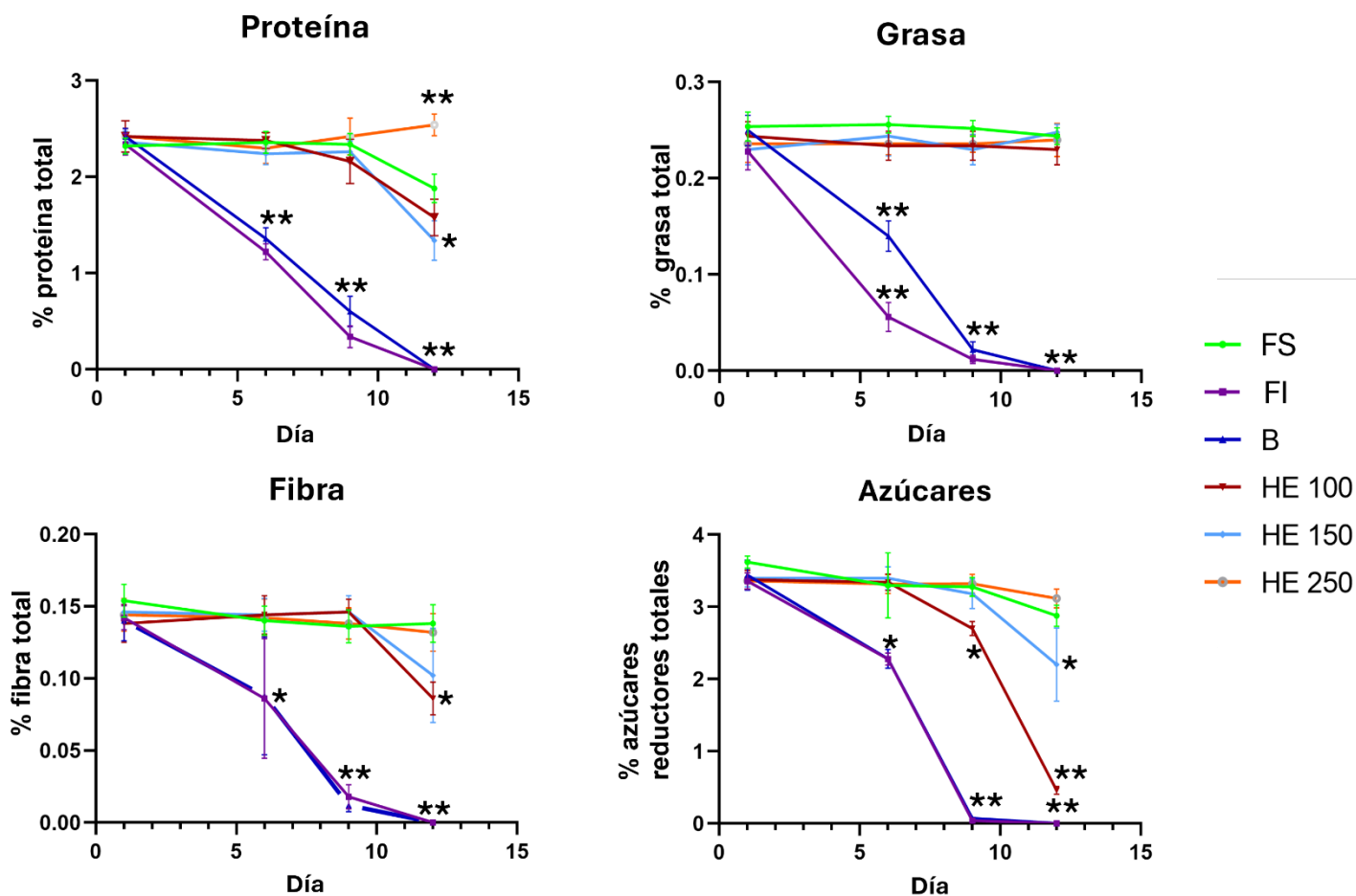


Figura 30. Contenido de proteína (a), grasa (b), fibra total (c) y azúcares reductores (d) en fresas tratadas con hernandulcina (HE) en infectadas *R. stolonifer*. n=5, ** indica la presencia de diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) por ANOVA Tukey.

7.8.1 Variación de proteína total en fresas infectadas con *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

La concentración inicial promedio de proteína en el fruto de fresa fue del 2.3%. De acuerdo con el análisis estadístico no existió diferencia significativa en el contenido de proteína entre los grupos de fresas sanas y aquellas tratadas con HE ($p < 0.01$) hasta el día 9 (Figura 30a). La tendencia de estos tres grupos fue similar en el tiempo con una caída significativa en fresas sanas y con HE (100 y 150 mg/L). Por otra parte, se determinó una clara pérdida en el

contenido de proteína en el grupo de fresas tratado con benomilo y el grupo de fresas infectadas desde el día 6 sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre el grupo de HE 250 mg/L respecto al grupo de fresas sanas y HE (100 y 150 mg/L) al día 12.

7.8.2 Variación de grasa total en fresas infectadas con *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

En la Figura 31b se muestra la concentración del contenido de grasa total, en un promedio inicial de 0.23%. Los resultados indicaron que los niveles de los grupos de fresas sanas y los tratamientos con HE (100, 150 y 250 mg/L) se mantuvieron sin variaciones ni diferencias estadísticas durante 12 días. Las fresas infectadas y las tratadas con benomilo presentaron un decremento en el contenido de grasa a partir del día 6, tiempo en el que las fresas mostraron infección avanzada. Para el día 9, el contenido se redujo a un 0.01%. Tras el día 6 se observaron diferencias estadísticamente significativas en respecto al grupo de fresas sanas ($p < 0.01$).

7.8.3 Variación de fibra total en fresas infectadas con *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

Lo niveles de fibra en fresas sanas y las tratadas con HE 250 mg/L se mantuvieron en un promedio de 0.13% sin diferencias significativas entre estos grupos (Figura 30c). Se observó que en fresas con HE a 100 y 150 mg/L ocurrió una disminución en el porcentaje de fibra al día 12, por lo que se mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre los grupos. Tanto fresas infectadas como las tratadas con benomilo disminuyó a 0.1 % en el contenido de fibra para el día 12. Entre estos dos últimos grupos no hubo diferencias estadísticamente significativas, pero contra los grupos de fresas tratadas con HE y fresas sanas.

7.8.4 Variación de azúcares reductores en fresas infectadas con *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

Las fresas tratadas con 250 mg/L de HE mantuvieron niveles estables de azúcares reductores (3.2%) del día 1 al día 12, mostrando diferencias significativas con los demás grupos (Figura 30d). Por otra parte, el grupo de fresas sanas mostró una reducción porcentual de 0.74 % para al día 12, sin diferencias estadísticamente significativas contra las tratadas con HE a 250 mg/L.

El tratamiento de HE 100 mg/L perdió efectividad contra el grupo de fresas sanas al día 9, mientras que el tratamiento HE 150 mg/L perdió efectividad al día 12, ambos presentando diferencias significativas.

El tratamiento con benomilo no protegió el contenido de azúcares, siendo indetectable para el día 12, mientras que el grupo de fresas infectadas decreció sus niveles de azúcares reductores a un 0.01% en el mismo periodo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

7.9 Variación del contenido de antocianinas en fresas infectadas con *B. cinerea* tratadas con hernandulcina

El contenido de antocianinas fue determinado y cuantificado para conocer la protección de la hernandulcina sobre las moléculas con actividad nutracéutica de la fresa ante la infección de *B. cinérea* (Figura 31).

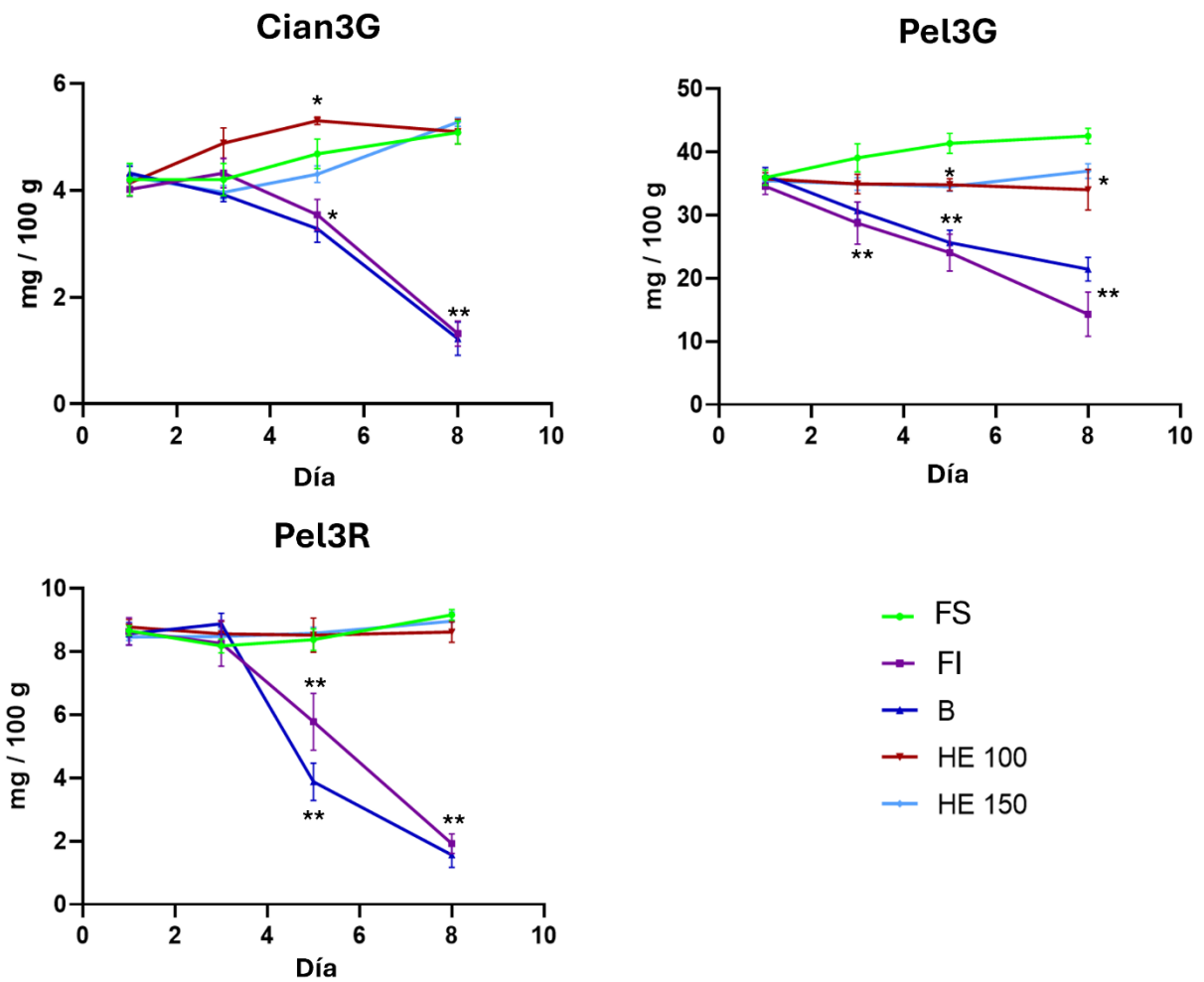


Figura 31. Niveles de antocianinas en fresa tratada con hernandulcina (HE) ante la infección con *B. cinerea*. a) Concentración de cianidina-3-O-glucósido. b) Concentración de pelargonidina-3-O-glucósido. c) Concentración de pelargonidina-3-O-rutinósido. ** indica la presencia de diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) por ANOVA Tukey. n=5

La concentración promedio de cianidina-3-O-glucósido fue de 4mg/100g para fresas del cultivar Camino Real sanas (Figura 32a). Interesantemente, los niveles de esta antocianina en fresas sanas y los grupos tratados con hernandulcina (100 y 150 mg/L) se mantuvieron entre 4 y 5 mg/100g hasta el día 8 sin diferencias significativas entre estos grupos ($p < 0.01$). Al día 8, en el grupo de fresas infectadas y las tratadas con benomilo decreció el nivel en ambas hasta 1.5 mg/100g. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, pero sí entre los grupos de hernandulcina y fresas sanas en comparación con los grupos de fresas infectadas y aquellas tratadas con benomilo ($p < 0.01$).

La pelargonidina-3-O-glucósido fue la antocianina mayoritaria en las fresas estudiadas (Figura 31b). En los grupos de frutas sanas se observó una variación de 36 mg/100g al día 1 hasta 42 mg/100g al día 12. Los tratamientos con hernandulcina (100 y 150 mg/L) mantuvieron un valor constante y sin diferencia estadística entre ellos ($p < 0.01$), con un promedio de 35.4 mg/100g. Por otra parte, las fresas tratadas con benomilo y el grupo infectado mostraron una pérdida de hasta 21 mg/100g. Esta pérdida representó una importante diferencia estadística.

La concentración de la pelargonidina-3-O-rutinósido fue inicialmente de 8.6 mg/100g en promedio en el modelo de estudio. Los grupos fresas sanas y aquellas tratadas con hernandulcina (100 y 150 mg/L) no presentaron grandes variaciones en su concentración, la variación medible fue de 9.1 a 8.7 mg/100g, respectivamente. Por lo anterior, no se observaron variaciones estadísticamente significativas entre estos grupos ($p < 0.01$).

La concentración de esta antocianina para fresas infectadas y las tratadas con benomilo decreció a 1.9 mg/100g y 1.5 mg/100g al día 8, respectivamente. Por lo tanto, se muestra que ambos grupos muestran diferencias estadísticas contra los grupos de fresas sanas y con tratamiento de HE.

7.10 Variación del contenido de antocianinas en fresas infectadas por *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

El fitopatógeno *R. stolonifer* causó un efecto de pudrición en fresas más severo que aquel producido por *B. cinerea*. Esto también se corroboró en la degradación de antocianinas por un periodo de 12 días post-infección (Figura 32).

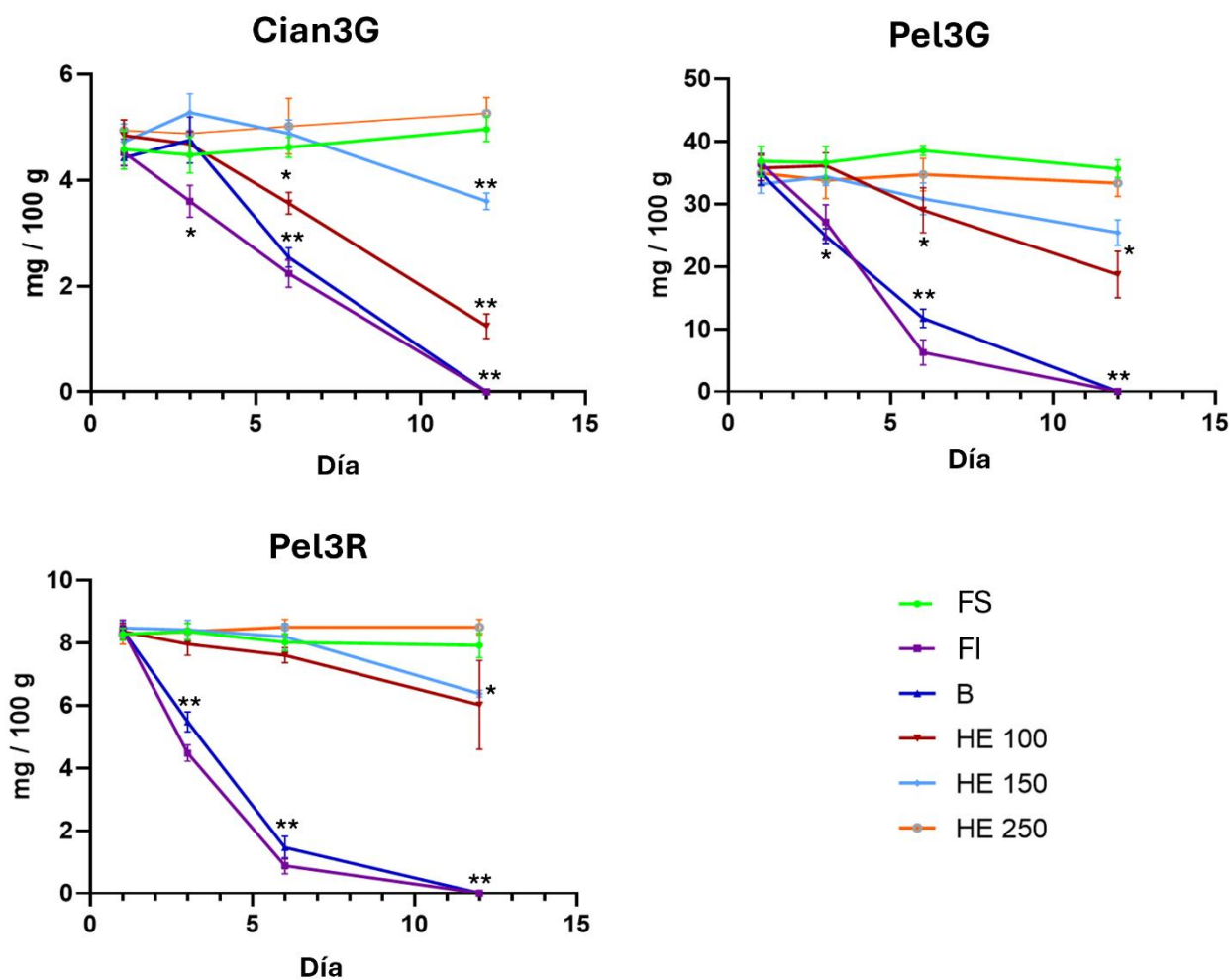


Figura 32. Niveles de antocianinas en fresa tratada con hernandulcina (HE) ante la infección con *R. stolonifer*. a) Concentración de cianidina-3-O-glucósido. b) Concentración de pelargonidina-3-O-glucósido. c) Concentración de pelargonidina-3-O-rutinosido. n=5, * indica diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) en la prueba de ANOVA, Tukey.

La hernandulcina mostro una clara propiedad protectora contra el desarrollo de *R. stolonifer*. Sin embargo, la dosis más efectiva (250 mg/L) fue mayor que aquella usada para controlar el crecimiento de *B. cinerea* (150 mg/L).

Las fresas usadas para el ensayo de hernandulcina sobre el crecimiento de *R. stolonifer* tuvieron una concentración inicial de cianidina-3-O-glucósido de 4.67 mg/ 100 g en promedio. En los grupos de fresas infectadas y tratadas con benomilo la antocianina no fue detectada en el día 12.

Mientras tanto, los grupos de fresas sanas y HE 250 mg/L no sólo mantuvieron la concentración de cianidina, si no que la lectura de la concentración era más alta en el grupo HE 250 mg/L que en fresas sanas por 0.3 mg/100g. No obstante, esto no representó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$). El grupo de hernandulcina 100 mg/L mostró una concentración de 1.2 mg/ 100 g al día 12. El grupo hernandulcina 150 mg/L disminuyó su contenido a 3.6 mg/100g. Ambos grupos implican una diferencia estadística entre ellos y los demás grupos ($p < 0.01$).

Para el caso de la pelargonidina-3-O-glucósido, esta tuvo una concentración promedio de 35.3 mg/100g mientras que los grupos fresas infectadas y el grupo tratado con benomilo no tuvieron niveles detectables al día 12. Los grupos tratados con hernandulcina (100 y 150 mg/L) presentaron diferencias significativas con valores menores respecto a fresas sanas. Para el día 12, la concentración de esta antocianina en el grupo tratado con 100 mg/L fue de 18.7 mg/100g mientras que para el grupo tratado con 150 mg/L fue de 25.4 mg/100g. Los grupos tratados con hernandulcina 250 mg/L y fresas sanas mantuvieron su valor al día 12, con 33.3 y 35.6 mg/100g, respectivamente. Entre estos grupos no existieron diferencias estadísticamente significativas, pero sí respecto a los demás grupos ($p < 0.01$).

En lo referente a la pelargonidina-3-O-rutinósido, esta antocianina presentó una concentración de 8.3 mg/100g. El grupo de fresas tratado con 250 mg/L de hernandulcina no mostró diferencias estadísticamente significativas con fresas sanas, pero sí contra el resto de los grupos. La concentración final en este grupo fue de 8.5 mg/100g.

Al día 12 la concentración de pelargonidina-3-O-rutinósido no fue detectable en los grupos tratados con benomilo y fresas infectadas. Los grupos de fresas tratadas con hernandulcina a una concentración de 100 y 150 mg/100g se mantuvieron en valores muy parecidos, al día 12 con 6 y 6.3 mg/100g respectivamente. Esto indicó la ausencia de diferencias significativas entre ambos, pero la existencia de diferencias significativas en los demás grupos.

7.11 Contenido de fenoles en frutos infectados por *B. cinérea* y *R. stolonifer* tratados con hernandulcina

En la Figura 33 se muestra el contenido de fenoles en las muestras de fresas estudiadas.

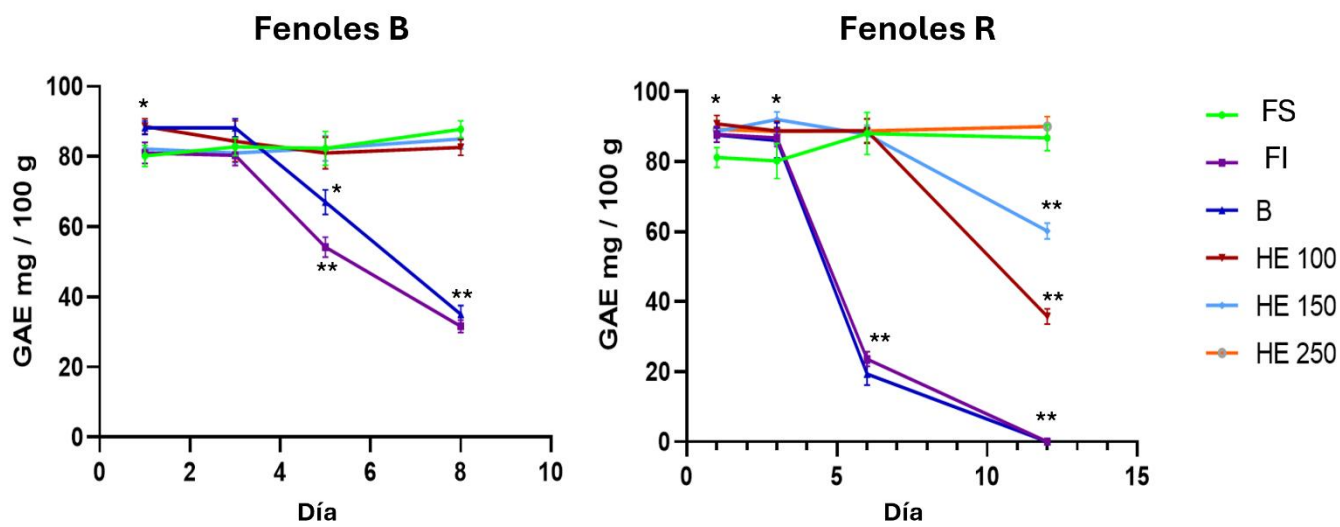


Figura 33. Contenido de fenoles en fresas tratadas con hernandulcina e infectadas con *B. cinérea* (a) y *R. stolonifer* (b). n=5 ** indica la presencia de datos altamente significativos ($p < 0.01$) por ANOVA Tukey.

El contenido total de los fenoles presentes en el fruto de fresa fue cuantificado en equivalentes de ácido gálico mg/100g (GAE por sus siglas en inglés). El contenido inicial encontrado en los frutos en estudio tuvo un rango de 84 a 87 GAE mg/100g. En la Figura 33a, los grupos de fresas sanas y HE (100 y 150 mg/L) los valores se mantuvieron estables hasta el día 8 con un promedio de 85.3 GAE mg/100g. Existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre el grupo de fresas tratadas con benomilo y el de fresas infectadas con *B. cinérea* los cuales no sobrepasaron los 35 GAE mg/100g al día 8. Para el caso de las fresas infectadas con *R. stolonifer* los grupos de fresas sanas y aquellas tratadas con 250 mg/L de hernandulcina mostraron 88.4 GAE mg/100g sin evidenciar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos grupos, pero sí contra los demás. HE 100 y 150 mg/L disminuyeron hasta 35.8 y 60.2 GAE mg/100g respectivamente. En los grupos de fresas infectadas y aquellas infectadas con benomilo no existió contenido de fenoles

detectable al día 12.

7.12 Capacidad antioxidante de frutos infectados por *B. cinerea* y *R. stolonifer* tratadas con hernandulcina

La actividad antioxidante es medida de varias formas, sin embargo, una forma común de hacerlo es mediante equivalente a trolox (TEAC por sus siglas en inglés) en $\mu\text{M/g}$.

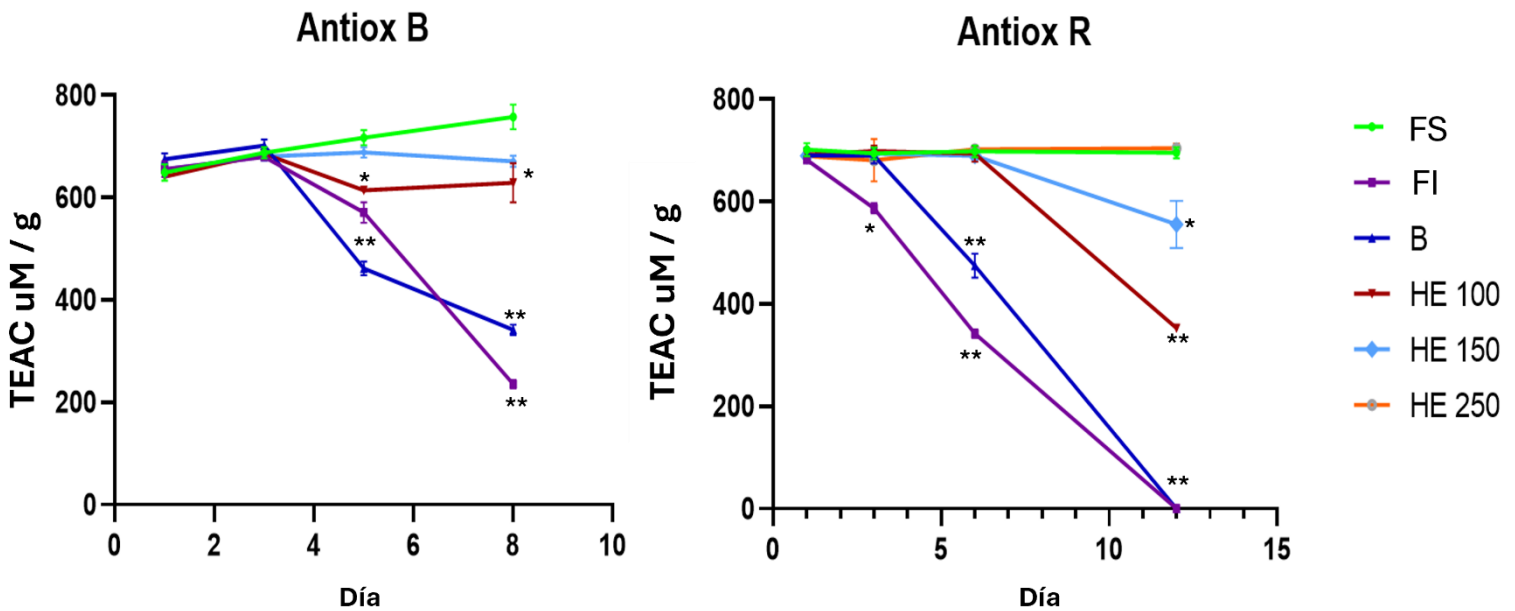


Figura 34. Capacidad antioxidante de fresas evaluadas contra a) *B. cinerea* y b) *R. stolonifer*. $n=5$ * indica la presencia de datos estadísticamente significativos ($p < 0.01$) por ANOVA Tukey.

En términos generales, la capacidad antioxidante de las fresas en estudio tuvo un promedio de 655.2 $\mu\text{M/g}$ de TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes trolox) (Figura 35a). Las fresas sanas mostraron una elevación de su capacidad antioxidante con diferencias estadísticas ($p < 0.05$) respecto a los demás grupos ($p < 0.05$). Mientras que las fresas tratadas con HE (100 y 150 mg/L) mantuvieron sus niveles del día 1 al 8 sin diferencias significativas. Los grupos de fresas tratadas con benomilo e infectadas con *B. cinerea*, conservaron menos de la mitad de su capacidad antioxidante al día 8. Las fresas infectadas con *R. stolonifer* presentaron un promedio de 690 $\mu\text{M/g}$ de TEAC. Los grupos de fresas sanas y tratadas con HE (100, 150 y 250 mg/L) mostraron el mismo comportamiento sin cambios hasta el día 6

(Figura 34). Las fresas sanas y las tratadas con HE 250 mg/L no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) al día 12, con un promedio de 699.9 uM/g de TEAC. Los grupos restantes mostraron diferencias estadísticamente significativas. Al día 12 los tratamientos de hernandulcina a 150 mg/L mostraron una capacidad de 555.5 uM/g TEAC, mientras que los de 100 mg/L tuvieron una 352.7 uM/g TEAC. En el caso de las fresas infectadas y el grupo tratado con benomilo no hubo valores detectables de capacidad antioxidante al final del experimento, el día 12.

8. DISCUSIÓN

La fresa es un cultivo de gran importancia económica en el país y recientemente para el estado de Puebla (Ramírez *et al.*, 2020; Salazar *et al.*, 2017). La producción de fresa ha crecido fuertemente en el estado, por lo tanto, es necesario prever un tratamiento para la protección de este cultivo contra las infecciones fúngicas durante el almacenamiento y transporte. La finalidad es disminuir la merma de este producto hortícola causada por dos de los principales hongos asociados a la pudrición de la fresa, *B. cinerea* y *R. stolonifer*.

En este trabajo se aislaron e identificaron dos especies distintas de hongos fitopatógenos de la fresa en etapa poscosecha que se comercializa en el estado de Puebla. Se documentó que estos hongos están presentes durante el almacenamiento de la fresa y fueron los responsables de causar pudrición en los frutos infectados. Estos hongos, previamente nombrados como C2 y C3, fueron identificados por técnicas moleculares y morfológicas como *Botrytis cinérea* y *Rhizopus stolonifer*, respectivamente. Respaldando los hallazgos de esta investigación estos mismos agentes infecciosos ya se han reportado con anterioridad como agentes causales de pudrición blanda en el fruto (Cano, 2014).

Con respecto a la identificación por técnicas moleculares, en este trabajo se corrobora la gran utilidad de la secuenciación de genes específicos del ADN genómico como estrategia de identificación de hongos, lo cual permite tener certeza sobre su identidad, reforzando las observaciones morfológicas que son elementales en la clasificación de microorganismos (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022). Para la identificación molecular de los hongos se eligió como blanco la región espaciadora transcrita interna (ITS) entre los genes 18S y 28S, ya que es una región que tiene las divergencias suficientes para lograr diferenciar entre una gran variedad de especies, lo que lo coloca como uno de los mejores marcadores universales. Las regiones

de ITS son tan relevantes porque tienen una gran fidelidad durante la replicación de cadenas de ADN por PCR y otorgan certeza para la identificación de géneros, sin embargo, la exactitud disminuye cuando se trata de identificar a nivel especie de algunos géneros (Stielow *et al.*, 2015). Por esta razón se utilizó también la secuencia de β -tubulina, este gen codifica para una proteína estructural, sin embargo, en su secuencia es capaz de mostrar diferencias evolutivas más específicas, estos pequeños cambios permiten identificar cambios que orientan de manera más específica para diferenciar entre especies de algunos géneros (Stielow *et al.*, 2015). La combinación de la secuenciación de ambas regiones del genoma de los hongos nos permitió una mejor asignar la identidad de los patógenos estudiados. Con la certeza de identificación los siguientes experimentos se realizaron nombrando a los hongos por su nombre científico, dejando la nomenclatura previa a la identificación (C2 y C3).

Tras el aislamiento de las cepas y la identificación de los hongos, siguieron las pruebas de dilución en microplaca, las cuales ayudaron a determinar la CMI para los hongos gracias a la reacción colorimétrica de la resazurina. Este método ha sido estandarizado para detectar viabilidad de células de microorganismos, en este caso hongos. El cambio en la colorimetría de la resazurina indica la viabilidad del metabolismo de las células fúngicas, ya que es una sustancia que puede permear las membranas celulares y reaccionar con enzimas vitales de la célula. La resazurina es de color azul en un estado oxidado, al entrar en contacto con enzimas activas provenientes del metabolismo de un organismo vivo, como deshidrogenasas dependientes de NAD(P)H u oxidorreductasas, lo que reduce la resazurina a resorufina que es de color rosa (Herman *et al.*, 2024). Este cambio colorimétrico se puede observar en las pruebas contra *R. stolonifer* cuando la concentración de HE fue menor a 200 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, para las pruebas contra *B. cinerea* en la concentración de HE menor a 100 $\mu\text{g/mL}$ el pozo se tornó de un color amarillo/naranja. Esta última reacción colorimétrica podría deberse a una nueva reducción que degrade el color rosa de la muestra, aunque el subproducto sea incoloro, el pH del medio o metabolitos del hongo podrían interferir con el color del pozo. En general, las concentraciones de HE en los rangos asignados mostraron un cambio en el color del medio, lo que indica la ausencia de actividad de las enzimas participes de la respiración celular, por lo tanto, una inhibición.

El uso de la HE estaba dirigido principalmente como edulcorante no calórico (Arribas, 2019), por lo tanto, no se había estudiado como un posible antifúngico, siendo este el primer reporte

de la actividad antifúngica de la HE. Por ende no existen registros para comparar las concentraciones de HE utilizadas en este estudio. Sin embargo, a nivel estructural, la HE es una molécula pertenece al grupo de los bisabolanos y debido a la similitud de su estructura, es posible que actúe de manera análoga al bisabolol (alfa-bisabolol), que es un sesquiterpeno monocíclico (de Medeiros *et al.*, 2021).

La actividad antifúngica del alfa-bisabolol fue evaluada contra *Fusarium oxysporum* aislado de granos de maíz (*Zea mays*). Los experimentos mostraron tres distintas CMI dependiendo de la cepa que atacaron. La MIC más baja encontrada fue de 128 µg/mL y la más alta de 1024 µg/mL (de Medeiros *et al.*, 2021). Se ha propuesto que su actividad como antifúngico se debe a la interacción del bisabolol con la membrana de las hifas, induciendo apoptosis (Jamzivar *et al.*, 2019). El mecanismo no está completamente elucidado pero la hipótesis se basa en que el bisabolol interfiere con la enzima $\Delta 24$ -esterol metiltransferasa. Esto afecta la síntesis del ergosterol presente en la pared celular de los hongos, como lo sugirió la inhibición de *Aspergillus fumigatus* por bisabolol a una concentración de 5mM o 1111.9 µg/mL (Jahanshiri *et al.*, 2017). Comparando, las dosis más altas de la CMI de bisabolol fueron mayores a 1000 µg/mL, mientras que la dosis más alta de HE utilizada en este estudio para la CMI fue de 250 µg/mL, siendo una dosis de tres a cuatro veces más baja del compuesto activo.

Si bien no se trata de la misma molécula, es posible que la HE y el bisabolol compartan mecanismos de acción, lo cual sólo puede ser confirmado o negado con estudios específicos a nivel bioquímico y simulaciones de la dinámica molecular. El mecanismo de acción de la HE puede ser estudiado a fondo en próximas investigaciones y evaluado contra otros fitopatógenos de interés agrícola. Por otro lado, el presente trabajo plantea un posible rol ecológico de la HE más allá de su sabor dulce y uso como edulcorante. Este estudio, junto con el trabajo de Villa-Ruano *et al.* (2021), sugieren que la hernandulcina es un metabolito producido por la planta *Phyla scaberrima* como respuesta ante el ataque por hongos. Al mismo tiempo, esto potenciaría en uso de la HE sumando esta cualidad antifúngica, protegiendo a la fresa del ataque por hongos, mejorando la apariencia y calidad por un periodo más largo.

Según la Food and Agriculture Organization (FAO), la apariencia de un alimento es el parámetro más importante que determina en primera instancia su calidad. Dentro de la apariencia se puede mencionar al color, la forma, el tamaño y la madurez como las más importantes (López, 2003). De una manera más específica, la madurez es indicada por el

color y la firmeza de un fruto, en este caso, la fresa. Los tratamientos con HE promovieron la conservación de la firmeza (fibra) del fruto, así como el contenido de antocianinas, lo que se traduce directamente como una preservación del color del fruto. En consecuencia, se puede afirmar que la HE, en la concentración indicada, preserva los parámetros de calidad por la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos contra los que fue evaluada.

Una vez comprobado su efecto contra *B. cinerea* y contra *R. stolonifer* en los experimentos *in vitro* se continuó con los experimentos *ex vivo*. En estos experimentos se documentó la protección del tratamiento con HE sobre la fresa, la evolución de la infección del hongo y el comportamiento de los niveles en los parámetros de calidad establecidos.

En los grupos de Fresas Infectadas, tanto por *B. cinerea* como por *R. stolonifer*, el fruto termina completamente dañado y con la completa pérdida de calidad para su consumo (Figura 25 y 26). En estos grupos se muestra el efecto devastador de la infección por hongos fitopatógenos en el fruto. La proliferación de las hifas en la superficie total del hongo ocurrió en 8 días bajo la infección de *B. cinerea* y en 3 días cuando fue causada por *R. stolonifer*. Este comportamiento muestra la fuerte agresividad de *R. stolonifer* respecto a su competidor.

Como se puede observar en las Figuras 25 y 26, en los grupos control de infección (fresas infectadas) donde la infección se desarrolló sin la intervención de un tratamiento que lo evite, el fruto termina con la proliferación del hongo en la totalidad de su superficie y con la completa pérdida de calidad para ser consumido. En estos grupos se ilustra el efecto devastador causado por la proliferación de los hongos fitopatógenos en el fruto. En cambio, en los grupos de fresas tratadas con HE, también infectadas por hongos, la calidad del fruto se conservó de una manera evidente. El tratamiento con HE prolongó la vida útil de las fresas y su calidad de 3 a 9 días más que el control de infección. Como es sabido, los frutos que muestran una apariencia sana, comestible y apetecible cumplen con los criterios de calidad de frutas (López, 2003).

Mediante inspección visual, los tratamientos con HE protegieron mejor a la fresa que el tratamiento con el fungicida químico. El benomilo no generó efecto protector contra la infección por ambos hongos. Esto concuerda con el registro décadas atrás que indica la existencia de cepas de *B. cinerea* resistente a este plaguicida sintético (Bollen y Scholten, 1971). Este control químico no es útil para el control de estas cepas. Su aplicación resulta contra productiva debido a la toxicidad del compuesto. De acuerdo con evidencia publicada,

la aplicación de este agroquímico contamina el alimento, ya sea fresa o cualquier otra hortaliza, por lo tanto, su consumo podría ser responsable de riesgos a la salud humana (Díaz-Vallejo *et al.*, 2021). La ineffectividad del fungicida químico es una prueba de la necesidad de reemplazar este tipo de pesticidas por agentes más amigables con el ambiente, fortaleciendo una transición agroecológica al combate de fitopatógenos.

Volviendo a la parte de la descripción cuantitativa del efecto de la HE sobre los compuestos de la fresa, enfocados en nutrientes, antocianinas, capacidad antioxidante y contenido de fenoles los datos mostraron una tendencia muy similar a la descrita anteriormente.

La detección e identificación de tres distintas antocianinas presentes en las fresas se determinó gracias a la técnica HPLC acoplada a espectrometría de masas. Estas antocianinas le confieren al fruto de fresa su característica actividad antioxidante. La presencia y abundancia de estas moléculas ya han sido reportadas en trabajos previos (Nour *et al.*, 2017). Las antocianinas identificadas fueron la cianidina-3-O-glucósido, la pelargonidina-3-O-glucósido y la pelargonidina-3-O-rutinósido.

La aplicación de HE en fresa fue efectiva para proteger el contenido de proteína, grasa, fibra, azúcares reductores, firmeza, fenoles y la capacidad antioxidante en fresas contra estos los hongos fitopatógenos encontrados que causan pudrición. Según la evaluación estadística, no existe diferencia entre los grupos infectados con *B. cinerea* al que se le trató con 100 mg/L de HE y el grupo al que se le aplicó HE a 150 mg/L. Por lo tanto, el control de este hongo podría controlar eficientemente con el tratamiento de HE 100 mg/L al ser la concentración más baja. Además, se pudo inferir que el benomilo no es una opción viable para proteger al fruto de la infección por *B. cinerea* durante la poscosecha.

En el modelo de fresa infectado con *R. stolonifer*, el tratamiento de HE a 250 mg/L mostró mejores resultados en cada evaluación a pesar de la visible agresividad y velocidad de crecimiento del hongo. En cada experimento se demostró que el fungicida químico benomilo no protegió a la fresa de la infección por este hongo. Los datos indican que la aplicación de HE resultó en el mantenimiento de los indicadores de calidad de la fresa hasta el día 12, sin diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control de fresas sanas. Esto indicó una robusta capacidad de la HE para inhibir el crecimiento de *R. stolonifer* en frutos de fresa. Al término del proceso experimental los resultados mostraron que los grupos tratados con HE también mantuvieron los niveles de antocianinas en el fruto sin

diferencias estadísticamente significativas contra fresas sanas.

En caso de que este tratamiento sea utilizado, la conservación de los parámetros de calidad y la protección que otorga este tratamiento significaría evitar serias pérdidas en los lotes cosechados y transportados, así como pérdidas económicas a los productores de fresa del estado de Puebla. Con una producción protegida en la poscosecha del ataque por hongos fitopatógenos los agricultores del estado podrían transportar su producto a lugares más lejanos e incluso exportarlo con seguridad e inocuidad evitando la presencia de agroquímicos en el producto final que impidan su comercialización fuera del país (Rozas y Rivers, 2018).

Si bien la HE aporta un sabor dulce, son necesarios ensayos organolépticos para determinar si este tratamiento influye en el paladar humano y podría ser en determinado caso, un valor agregado para el consumo de fresa, así como de otros frutos al aumentar su sabor dulce sin aumentar la cantidad de calorías. Otro aspecto para considerar es el efecto residual. Estas investigaciones abren nuevas y necesarias líneas de investigación que representan oportunidades por abordar.

9. CONCLUSIONES

Se cumplió el **Objetivo General**: “Determinar si la hernandulcina tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos de frutos de fresa (*Fragaria × ananassa* cv. Camino Real) comercializados en la ciudad de Puebla, México”

La HE posee actividad fungistática contra los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* que afectan a fresas comercializadas en la ciudad de Puebla. Aunque la actividad es fungistática, protege al fruto mejor que la opción química comercial, el benomilo. Esta investigación contribuyó a elucidar en parte el papel de la HE como metabolito secundario, actuando como un fungistático y evaluando su acción *in situ*.

Objetivo 1: Se aislaron y se lograron identificar dos hongos fitopatógenos de importancia agrícola, los cuáles son causantes de pérdidas graves en la etapa poscosecha. *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer* fueron los responsables de causar podredumbre en las fresas.

Objetivo 2: La HE protegió a la fresa de la proliferación fúngica y evitó la degradación de compuestos nutrimentales hasta por 12 días.

El tratamiento evitó el crecimiento de tejido fúngico sobre los frutos, también evitó la degradación de la mayoría de los componentes de importancia nutrimental. Esto significa

que puede prolongar la vida de anaquel de la fresa. Por lo tanto, su uso en la poscosecha evitaría pérdidas económicas importantes en la cadena productiva.

Objetivo 3: La hernandulcina es eficaz para conservar la calidad* de la fresa a una concentración óptima de 100 mg/L ante la infección causada por *B. cinerea*.

El uso de hernandulcina es eficaz para conservar la calidad* de las fresas a una concentración de óptima de 250 mg/L ante la infección causada por *R. stolonifer*.

*firmeza, así como niveles de grasas, azúcares reductores, proteínas, fibra, firmeza, fenoles y capacidad antioxidante

El uso de hernandulcina es eficaz para conservar la firmeza del fruto de fresa, así como niveles de grasas, azúcares reductores, proteínas, fibra, fenoles y capacidad antioxidante en fresa a una concentración óptima de 100 mg/L ante la infección causada por *B. cinerea*.

El uso de HE es eficaz para conservar la firmeza, así como niveles de grasas, azúcares reductores, proteínas, fibra, firmeza, fenoles y capacidad antioxidante en fresas a una concentración de óptima de 250 mg/L ante la infección causada por *R. stolonifer*. Se demuestra una clara ventaja sobre el tratamiento convencional químico con benomilo.

La HE no es tóxica para los seres humanos en las concentraciones utilizadas, y al ser una molécula de origen natural se puede considerar como una alternativa agroecológica al uso de pesticidas sintéticos aplicados a fresas listas para su consumo.

En este trabajo se describe por vez primera el uso de HE como un antifúngico, marcando un referente para futuras investigaciones y se demuestra uno de sus roles ecológicos hasta ahora ignorados.

10. BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC international, 18th edn. AOAC International, Gaithersburg

Alam, M. Ashraful, Islam, P., Subhan, N., Rahman, M.M., Khan, F., Burrows, G. E., Nahar, L. y Sarker, S. D. 2021. «Potential health benefits of anthocyanins in oxidative stress related disorders. » *Phytochemistry Reviews* 20(4):705-49. doi: 10.1007/s11101-021-09757-1.

Altamirano, H. C. R. 2015. «“El Cultivo De La Fresa Para El Ciclo Otoño-Invierno, En California, Estados Unidos De Norte América”». Universidad De Guadalajara Centro Universitario De Ciencias Biológicas Y Agropecuarias, 9(17), 43. <https://hdl.handle.net/20.500.12104/22425>.

Arribas, S. A. (2019) «Estudio de La Hernandulcina: Conexión Estructura-Propiedad». *Universidad de Valladolid*. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/38118>.

Arroyo, C. A. J., y Hernández, F. A. A. (2021). Competitividad de la fresa mexicana en el mercado estadounidense de 1992 a 2017. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 22(1). https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num1_art:1414

Arias, D. L, Montañó, L. N. D., Velasco, M. A. S, y Martínez, J. G. (2018). Alimentos funcionales: avances de aplicación en agroindustria. *Tecnura*, 22(57), 55–68. <https://doi.org/10.14483/22487638.12178>

Ávila-Arce, A., y González-Milán, D. de J. (2012). La competitividad de las fresas (*Fragaria spp.*) mexicanas en el mercado nacional, regional y de Estados Unidos. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 9(1), 17–27

Bautista-Baños, S., Bosquez-Molina, E., y Barrera-Necha, L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). In *Postharvest Decay: Control Strategies*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00001-6>

Bollen, G. J., y Scholten, G. (1971). Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 77(3), 83–90. <https://doi.org/10.1007/BF01981496>

Cano, M. A. (2014). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria spp.*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 263–276. <https://doi.org/10.17584/rcch.2013v7i2.2240>

Castro A., D. M. L. (2021). Polifenoles: Compuestos Bioactivos Con Efectos Benéficos En La Prevención De Diabetes Tipo 2. *REDCieN*, 1(1), 6. <http://www.redcien.com/index.php/redcien/article/view/5>

Chen, K., Kortensniemi, M. K., Linderborg, K. M., y Yang, B. (2022). Anthocyanins as Promising Molecules Affecting Energy Homeostasis, Inflammation, and Gut Microbiota in Type 2 Diabetes with Special Reference to Impact of Acylation. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 71(2), 1002-1017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05879>

Compadre, C. M., Pezzuto, J. M., A. D. K. y S. K. K. (1985). Hernandulcin: An Intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature. *Science*, New Series, 227(4685), 417–419.

Compadre, C. M., Hussain, R. A., de Compadre Lopez, R. L., Pezzuto, J. M., y Kinghorn, A. D. (1988). Analysis of structural features responsible for the sweetness of the sesquiterpene, hernandulcin. *Experientia*, 44(5), 447–449. <https://doi.org/10.1007/BF01940543>

Compadre, C. M., Hussain, R. A., Lopez de Compadre, R. L., Pezzuto, J. M., y Kinghorn, A. D. (1987). The Intensely Sweet Sesquiterpene Hernandulcin: Isolation, Synthesis, Characterization, and Preliminary Safety Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(2), 273–279. <https://doi.org/10.1021/jf00074a027>

Coyotl-Pérez, W. A., Rubio-Rosas, E., Morales-Rabanales, Q. N., Ramírez-García, S. A., Pacheco-Hernández, Y., Pérez-España, V. H., Romero-Arenas, O., y Villa Ruano, N. (2022). Improving the Shelf Life of Avocado Fruit against *Clonostachys rosea* with Chitosan Hybrid Films Containing Thyme Essential Oil. *Polymers*, 14(10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/polym14102050>

de Medeiros, C. A. C., Pinto, Â. de V., de Oliveira, J. C., Silva, G. S., Arrua, J. M. M., Lima, I. O., & Pereira, F. de O. (2021). Evaluating the Antifungal Activity of α -

Bisabolol in Association with NaCl on *Fusarium oxysporum* in Maize Grains. *Current Microbiology*, 78(2), 604–610. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02313-8>

de Rosso, V.V. y Mercadante, A. Z. (2007). HPLC – PDA – MS / MS of Anthocyanins and Carotenoids from Dovyalis and Tamarillo Fruits AND. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9135–9141.

Fallah, A. A., Sarmast, E., y Jafari, T. (2020). Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of oxidative stress and antioxidative capacity: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal Of Functional Foods*, 68, 103912. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103912>

Farfán, B. C. D., Pérez, S. J. F., Vicente, M. J. (2012). Análisis químico y cuantificación de hernandulcina en orozús (*Phyla dulcis Trev.*) proveniente de diferentes regiones de Guatemala aplicados como parámetros de calidad fitoquímica del material vegetal silvestre o cultivado. *Universidad De San Carlos De Guatemala* (Vol. 10, Issue 9).

Franco-Gaytán, Iván, Saucedo-Veloz, Crescenciano, Calderón-Zavala, Guillermo, Cruz-Huerta, Nicacio, Teliz-Ortiz, Daniel, & Galicia-Cabrera, Rosa M.. (2018). Calidad y vida de anaquel de tres cultivares de fresa (*Fragaria ananassa*) tratadas con concentraciones altas de CO₂ por periodo corto. *Agrociencia*, 52(3), 393-406. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000300393&lng=es&tlng=es.

Gámez-Villazama, J.J. y Carrera, A.A. N. (2022). Aspectos preliminares del daño mecánico en frutas y hortalizas. *Revista de Ciencia y Tecnología. Agrollanía* Vol. 21, 61-72, ISSN 2665-0053

Herman, T. S., Da Silva Goersch, C., Bocca, A. L., & Fernandes, L. (2024). Resazurin to determine the minimum inhibitory concentration on antifungal susceptibility assays for *Fonsecaea* sp. using a modified EUCAST protocol. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 55(2), 1349-1357. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01293-2>

Ibáñez, F. C., Torre, P., Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de Nutrición y Bromatología Universidad Pública de Navarra*, 1–10. <https://www.bing.com/ck/a?!&&p=a320528cf7c88267f29785eb25c0f8ca0794bd1d>

8a32430998970df01a897faaJmltdHM9MTc0ODIxNzYwMA&ptn=3&ver=2&hsh=4&fclid=0fbbb8cb-316b-6052-2886-

ab993008619b&psq=Ib%3%a1%3%b1ez%2c+F.+C.%2c+Torre%2c+P.%2c+Irigoyen%2c+A.+(2003).+Aditivos+alimentarios.+%3%81rea+de+Nutrici%3%b3n+y+Bromatolog%3%ada+Universidad+P%3%bablica+de+Navarra%2c+1%e2%80%9310&u=a1aHR0cDovL2NIZ2ljZXAuY29tL3dwLWNvbnRlbnQvdXBsb2Fkcy8yMDE3LzAyL0FkaXRpdm9zLWFsaW1lbnRhcmlvcy0yMDAzLnBkZg&ntb=1

Jahanshiri, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Asghari-Paskiabi, F., Saghiri, R., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2017). α -Bisabolol inhibits *Aspergillus fumigatus* Af239 growth via affecting microsomal $\Delta 24$ -sterol methyltransferase as a crucial enzyme in ergosterol biosynthesis pathway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2214-9>

Jamzivar, F., Shams-Ghahfarokhi, M., Khoramizadeh, M., Yousefi, N., Gholami-Shabani, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2019). Unraveling the importance of molecules of natural origin in antifungal drug development through targeting ergosterol biosynthesis pathway. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(6), 448–459. <https://doi.org/10.18502/ijm.v11i6.2216>

Kirschbaum, D. S. (2021). Características botánicas, fisiología y tipos de variedades de fresas. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina Índice*, 2, 15.

Knapp, J. L., González-Pinzón, R., y Haggerty, R. (2018). The resazurin-resorufin system: Insights from a decade of “smart” tracer development for hydrologic applications. *Water Resources Research*, 54(9), 6877-6889

Kwon, J. H., Cheon, M. G., Choi, O., y Kim, J. (2011). First report of *Botrytis cinerea* as a Postharvest pathogen of blueberry in Korea. *Mycobiology*, 39(1), 52–53. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.1.052>

Katasonov, A. B. (2022). Anthocyanins for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases. *S S Korsakov Journal Of Neurology And Psychiatry*, 122(4), 16. <https://doi.org/10.17116/jnevro202212204116>

- Liston, A., Cronn, R., y Ashman, T. L. (2014). *Fragaria*: A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*, 101(10), 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., y Silva, P. (2020). Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
- Montiel-Frausto, Laura B., y Vásquez-López, Alfonso. (2021). *Botrytis cinerea*, agente causal de muerte de retoños de *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi en Oaxaca, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 44(2), 261-264. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.2.261>
- Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., y Contreras-Paredes, C. A. (2020). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(3), 434–449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>
- Nikbakht, E., Singh, I., Vider, J., Williams, L. T., Vugic, L., Gaiz, A., Kundur, A. R., y Colson, N. (2021). Potential of anthocyanin as an anti-inflammatory agent: a human clinical trial on type 2 diabetic, diabetic at-risk and healthy adults. *Inflammation Research*, 70(3), 275-284. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01438-1>
- Nour, V., Trandafir, I., y Cosmulescu, S. (2017). Antioxidant Compounds, Nutritional Quality and Colour of Two Strawberry Genotypes from *Fragaria* × *Ananassa*. *Erwerbs-Obstbau*, 59(2), 123–131. <https://doi.org/10.1007/s10341-016-0307-5>
- Pacheco-Hernández, Y., Lozoya-Gloria, E., Becerra-Martínez, E., Villa-Ruano, N. Nutraceutical Potential of Seven “Quelites” Harvested in the Northern Highlands of Puebla-México. *Horticulturae* 2023, 9, 18. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010018>
- Panchal, S. K., John, O. D., Mathai, M. L., y Brown, L. (2022). Anthocyanins in Chronic Diseases: The Power of Purple. *Nutrients*, 14(10), 2161. <https://doi.org/10.3390/nu14102161>

Pérez-Martín, J., y Di Pietro, A. (2004). *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi*. Springer. Vol. 7. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-22916-9>

Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E. E., Morgan, D. R., Kerr, M., Robertson, K. R., Arsenault, M., Dickinson, T. A., y Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolución* (Vol. 266, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0539-9>

Ramírez, L., Caamal, I., Pat, V., Martínez, D., y Pérez, A. (2020). Análisis de los indicadores de competitividad de las exportaciones de fresa mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(4), 815–827.

Ramírez P., L. C., Caamal C., I., Pat F., V. G., y Martínez L., D. (2016). Índice de competitividad de la fresa (*Fragaria vesca* L) de México en el mercado mundial. *Agroproductividad*, 9(5), 29–34.

Reis, J. F., Monteiro, V. V. S., De Souza Gomes, R., Carmo, M. M. D., Da Costa, G. V., Ribera, P. C., y Monteiro, M. C. (2016). Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *Journal Of Translational Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1076-5>

SAGARPA. (2017). Agrícola nacional FRESA. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>

Salazar, J., Somoza, E., Pérez, C., Velásquez, B., Torres, M., Huerta, G., y Ortega, L. (2017). Uso y manejo de plaguicidas en diferentes sistemas de producción de fresa en México. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 6, 27–42.

Sánchez, Y. (2015). Caracterización Morfológica Y Productiva De Selecciones Avanzadas De Fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.

Santoyo, J., y Martínez, C. (2009). Paquete tecnológico para la producción de fresa. *Fundacion Produce Sinaloa*. A. C., 1–8.

SIAP. (2024). Estadística de Producción Agrícola por Estado https://nube.agricultura.gob.mx/avance_agricola/

Soto, A. K. J. 2011. «Citocalasina y Benomil: Aspectos Químicos y Biológicos».

Recuperado: <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/6243>).

Suarez, O. D., y Morales, H. Y. (2018). *Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas*. <https://repository.uamerica.edu.co/items/6d2a6005-11c9-4978-ad1f-1852555cbcd4>

Surco-laos, F., Paucar, H. A., y Gamboa, W. Q. (2020). Determinación De Polifenoles Totales Y Actividad Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Grape Seeds Residues of Pisco Production. *Rev Soc Quim Perú*, 86(2), 123–131.

Stielow, J., Lévesque, C., Seifert, K., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A., Damm, U., Yilmaz, N., Houbraeken, J., Lombard, L., . . . Robert, V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia - Molecular Phylogeny And Evolution Of Fungi*, 35(1), 242-263. <https://doi.org/10.3767/003158515x689135>

Trinetta, V., McDaniel, A., Batziakas, K. G., Yucel, U., Nwadike, L., y Pliakoni, E. (2020). Antifungal packaging film to maintain quality and control postharvest diseases in strawberries. *Antibiotics*, 9(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090618>

Vardar, C., Ilhan, K., y Karabulut, O. A. (2012). The application of various disinfectants by fogging for decreasing postharvest diseases of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 66, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.11.008>

Ventura-Aguilar, R. I., Díaz-Galindo, E. P., Bautista-Baños, S., Mendoza-Acevedo, S., Munguía-Cervantes, J. E., Correa-Pacheco, Z. N., y Bosquez-Molina, E. (2021). Monitoring the infection process of *Rhizopus stolonifer* on strawberry fruit during storage using films based on chitosan/polyvinyl alcohol/polyvinylpyrrolidone and plant extracts. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.187>

Villa-Ruano, N., Castro-Juárez, C. J., Lozoya-Gloria, E., Ramírez-García, S. A., Cruz Durán, R., y Varela-Caselis, J. L. (2021). Hernandulcin Production in Cell Suspensions of *Phyla Scaberrima*: Exploring Hernandulcin Accumulation through Physical and Chemical Stimuli. *Chemistry and Biodiversity*, 18(11). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100611>

WHO. (1993). Benomyl. World Health Organization, 17(1), 78. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90165-2](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90165-2)

Zhao, X., y Yuan, Z. (2021). Anthocyanins from Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Their Role in Antioxidant Capacities in Vitro. *Chemistry & Biodiversity*, 18(10). <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100399>