BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

COMPLEJO REGIONAL NORTE, SEDE TETELA DE OCAMPO

LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

CONTROL BIOLOGICO POSCOSECHA DE *Neurospora dictyophora* EN *Fragaria ananassa* CON *Trichoderma harzianum*

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO (A) EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

PRESENTA

LINDAY VICTORIANO POSADAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ FILOMENO CONRADO PARAGUIRRE LEZAMA

Tetela de Ocampo, Puebla. 13 de junio de 2023.

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

COMPLEJO REGIONAL NORTE, SEDE TETELA DE OCAMPO

LICENCIATURA EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

CONTROL BIOLÓGICO POSCOSECHA DE *Neurospora dictyophora* EN *Fragaria ananassa* CON *Trichoderma harzianum*

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO (A) EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

PRESENTA

LINDAY VICTORIANO POSADAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ FILOMENO CONRADO PARRAGUIRRE LEZAMA

CODIRECTOR

DR. OMAR ROMERO ARENAS

ASESORES

M. C. ALFREDO BÁEZ SIMÓN
ING. VERONICA TORRES VALENCIA

Tetela de Ocampo, Puebla. 13 de junio de 2023

La presente tesis titulada: **CONTROL BIOLOGICO POSCOSECHA DE *Neurospora dictyophora* EN *Fragaria ananassa* CON *Trichoderma harzianum*** realizada por Linday Victoriano Posadas, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

LICENCIADO(A) EN INGENIERÍA AGROFORESTAL

Unidad Académica de Ingeniería Agroforestal

Consejo Particular integrado por:	**Firma:**
Director: Dr. José Filomeno Conrado Parraguirre Lezama	----------
Codirector: Dr. Omar Romero Arenas	----------
Asesor: M. C. Alfredo Báez Simón	----------
Asesor: Ing. Verónica Torres Valencia	----------

Tetela de Ocampo, Puebla. 13 de junio de 2023.

Tabla de contenido

Índice de figuras 5
DEDICATORIA 7
AGRADECIMIENTO 8
RESUMEN 9
ABSTRAC 10
1.1 JUSTIFICACIÓN 12
II. HIPÓTESIS 13
III. OBJETIVOS 13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 14
4.1 Material biológico 14
4.2 Análisis de secuencia y filogenia 14
4.3 Tasa de desarrollo micelial y velocidad de crecimiento 14
4.4 Prueba de patogenicidad 15
4.5 Postulados De Koch 16
4.6 Solidos solubles totales (SST) 16
4.7 Medios líquidos para *Trichoderma harzianum* 17
4.8 Determinación de proteínas totales 18
4.9 Análisis estadístico 18
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 19
5.1 Caracterización e identificación de *Neurospora dictyophora* 19
5.2 Filogenia 19
5.3 Postulados de Koch 20
5.4 Sólidos solubles totales (SST) 21
5.5 Velocidad de crecimiento (VC) y tasa de desarrollo (TD) 21
5.6 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) 23
5.7 Antibiogramas 24
5.8 Determinación de proteínas totales 25
VI. CONCLUSIÓN 26
VII. BIBLIOGRAFÍA 27

Índice de cuadros

Contenido		Página
Cuadro 1	Medios líquidos de inoculados con *T. harzianum*……	17
Cuadro 2	Benomyl 50 y captan 50, se evaluó la dosis comercial autorizada por la fabricante expresada en mg L^{-1}……..	17
Cuadro 3	La curva de calibración, método se realizó con Albumina de huevo preparando estándares de concentraciones de 1 a 10 g/mL Selva (2016) ……	18

Índice de figuras

Contenido		Página
Figura 1	Tipos de Inhibición determinada por Porter, (1923)……...	16
Figura 2	Morfología de la cepa MA_Nd20(cb9)……	19
Figura 3	Filogenia de *Neurospora dyctiophora*…….	20
Figura 4	Prueba de patogenicidad……..	21
Figura 5	Resultados observados por un refractómetro Mano 0-53% MASTER53M……..	21
Figura 6	Observación de las colonias……	22
Figura 7	Tasa de desarrollo micelial.…….	22
Figura 8	En la gráfica se muestra el ritmo de crecimiento de *Trichoderma harzianum (Th)* y *Neurospora dictyophora (Nd)* por día…….....	23
Figura 9	Antagonismo de la cepa T-H4 de *Tricohoderma harzianum* de acuerdo con la escala de Bell *et al*., (1982) y *Neurospora dictyophora*…….	23
Figura 10	Se muestran una gráfica que ilustra el comportamiento del	

crecimiento de *Neurospora dictyophora* por día y por tratamiento…… 24

Figura 11
Figura 12 Sensidiscos impregnados con tres diferentes medios de *Trichoderma harzianum*, sensidiscos impregnados con dos fungicidas y un tratamiento testigo…….. 25

Figura 13 Muestra la gráfica de medición de absorbancia y concentración de proteínas utilizando el método de Biuret……. 26

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios y a mi familia, a mis padres por creer en mí y enseñarme que con trabajo y esfuerzo todo es posible, a mi novio Carlos Claudio Rocha por tu paciencia, por tu comprensión, por tu empeño, por tu fuerza y por tu amor.

Me lleno de regocijo, al dedicarles este trabajo a cada una de las personas que de alguna u otra manera, contribuyeron a culminar con esta meta, que me ha permitido crecer intelectualmente como persona y como ser humano.

Depack Chopra decía: la gratitud abre la puerta al poder, a la sabiduría y a la creatividad del universo. Tú abres la puerta a través de la gratitud.

Así que solo me queda decirles gracias por todos los buenos momentos que compartieron conmigo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi comité de tesis, al Dr. Omar Romero Arenas, al Dr. José Filomeno Parraguirre Lezama, al M. C. Alfredo Báez Simón y al Ing. Verónica Torres Valencia, por permitirme trabajar en el laboratorio de hongos y patología vegetal del Eco-Campus Valsequillo, del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis padres por haberme brindado la oportunidad de estudiar con la tranquilidad de saber que cuento con su apoyo y a mi pareja que es incondicional, a mis hermanos que siempre creyeron en mi y me motivaron a no desistir en los momentos más difíciles, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano en los momentos difíciles.

Un trabajo de investigación es fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, quienes comparten con nosotros sus conocimientos y experiencias, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Doy gracias a Dios para cada una de las personas que conocí durante este proceso, pues cada uno de ellos aporto significativamente a mi vida.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado con el objetivo de caracterizar y determinar el efecto antagónico de *Trichoderma* THT4 sobre *Neurospora dictyophora* MA_Nd20 en fresa *(Fragaria ananassa) in vivo* e *in vitro*, contrastado con dos fungicidas químicos, las variables analizadas en el estudio fueron: La TD (tasa de desarrollo), la VC (velocidad de crecimiento) y el PICR (porcentaje de inhibición de crecimiento radial). El experimento se realizó en el laboratorio de hongos y patología vegetal del Eco-Campus, Valsequillo del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

La identificación de la colonia fúngica asociada a *Neurospora dictyophora* corresponde con la caracterización reportada por Morales *et al.*, 2020, misma que se realizó mediante la observación de estructuras reproductivas con ayuda de un microscopio. Mientras que para la variable VC, *Trichoderma harzianum* mostro superioridad que *Neurospora dictyophora* siendo los valores medios: 0.57 y 0.38 cm/día. Tomado los puntos RCF (radio de crecimiento final) del día 6 y RCi (radio de crecimiento inicial) del día 2 y T (tiempo) del día 6. En cuanto a la VC se mostró una superioridad en el valor promedio de la cepa THT4 de *T. harzianum* sobre MA_Nd20 de *N. dictyophora*, siendo los valores: 34 y 15 mm/hora respectivamente, obtenidos de la fórmula de velocidad a partir de la curva de la cinética de crecimiento de cada hongo respectivamente.

Palabras clave: caracterizar, fungicidas, estructuras, crecimiento.

ABSTRAC

The present research work was carried out with the objective of characterizing and determining the antagonistic effect of Trichoderma THT4 on *Neurospora dictyophora* MA_Nd20 in strawberry *(Fragaria ananassa)* in vivo and in vitro, contrasted with two chemical fungicides, the variables analyzed in the study were: TD (developmental rate), VC (growth velocity) and PICR (percentage radial growth inhibition). The experiment was carried out in the laboratory of fungi and plant pathology of the Eco-Campus, Valsequillo of the Institute of Sciences of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

The identification of the fungal colony associated with *Neurospora dictyophora* corresponds to the characterization reported by Morales *et al.*, 2020, which was carried out by observing reproductive structures with the help of a microscope. While for the variable VC, *Trichoderma harzianum* showed superiority than *Neurospora dictyophora* being the mean values: 0.57 and 0.38 cm / day. Taken the RCF points (final growth radius) of day 6 and RCi (initial growth radius) of day 2 and T (time) of day 6. Regarding the VC showed a superiority in the average value of the THT4 strain of *T. harzianum* over MA_Nd20 of *N. dictyophora*, being the values: 34 and 15 mm / hour respectively, obtained from the velocity formula from the curve of the growth kinetics of each fungus respectively.

Keywords: characterize, fungicides, structures, growth.

I. INTRODUCCIÓN

La fresa *(Fragaria sp.)* pertenece a la familia Rocaseae, es originaria de las regiones templadas del mundo y se caracteriza por tener tallos rastreros, nudosos y con estolones, hojas grandes trifoliadas, pecioladas, flores blancas y frutos rojos aromáticos, aunque nativas de Europa son frutas de gran apreciación a nivel mundial, por su aroma, color y textura (Khoshnevisan *et al.*, 2013; SAGARPA, 2005). La mayoría de las bayas de jardín son nativas de América del Norte: moras, arándanos, fresas y frambuesas. Las regiones de América, tanto del Norte como del Sur, han proporcionado la fresa de jardín: *Fragaria ananassa* (Bailey 1894).

Las fresas son una fuente importante de compuestos bioactivos como vitaminas C y K, filoquinona, folato y presentan constituyentes fenólicos con capacidad antioxidante, siendo consumidas principalmente en fresco o procesada, por ejemplo, mermeladas (Giampieri *et al.*, 2012). Debido a su apreciación y alta demanda el cultivo de fresa representa un importante recurso económico a nivel mundial y nacional, tan solo en 2016 China y EE. UU aportaron 55.3% del volumen de producción total mundial, mientras que México se posicionó en 3er lugar con 458,972 t. (SIAP, 2018). Particularmente en México su producción ha aumentado considerablemente en la última década, siendo ahora el tercer mayor productor a nivel mundial, las principales regiones productoras son Michoacán y Guanajuato en el centro de México y Baja California en el noroeste (Wu *et al.*, 2012).

Sin embargo, tal como lo mencionan Mahmud *et al.*, 2019, el cultivo de la fresa puede verse seriamente afectado por hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo y que dañan raíz, hojas y fruto. El impacto que tienen estas enfermedades fúngicas son de las principales limitaciones en su producción, además de que infligen pérdidas económicas significativas para las zonas dedicadas a este cultivo (Rubio *et al.*, 2014). De manera convencional el manejo de estas patologías se controla mediante el uso de pesticidas, lo que ha generado que los productores se vuelvan cada vez más dependientes de los agroquímicos (Chen *et al.*, 2016; Es-Soufil *et al.*, 2020). Estos productos químicos generan alto riesgo para la salud humana y ambiental, además de afectar la inocuidad de la fruta e incrementar los costos de producción (Molina *et al.*, 2006). Por esta razón, el uso de agentes químicos ha sido continuamente restringido debido al desarrollo de resistencia de los patógenos, la contaminación ambiental y el riesgo para la salud humana (Nava *et al.*, 2012; Cano, 2013).

Debido a las problemáticas ecológicas y ambientales antes mencionadas, actualmente el control biológico a través del uso de microorganismos que provengan del mismo ambiente de acción del fitopatógeno representa una alternativa viable (Gómez-De la Cruz *et al.*, 2018). Köhl *et al.*, (2011) resaltan la importancia del uso de microorganismos antagónicos como parte de los diversos enfoques de control biológico~~s~~, donde dicha interferencia natural entre microorganismos beneficiosos y patógenos vegetales contribuyen al desarrollo de sistemas de cultivo a modo de tapones naturales, impidiendo o limitando así el desarrollo de la fitopatología. El mecanismo por el cual los antagonistas microbianos suprimen las enfermedades postcosecha incluye principalmente la competencia por los nutrientes y el espacio, la producción de antibióticos, el parasitismo directo y la resistencia

inducida (Droby *et al.*, 2009). Actualmente se desarrollan formulados de agentes de control biológico, es decir, organismos vivos que reducen la población de insectos y patógenos plaga. Particularmente Romero *et al.*, (2017), destacan la importancia de *Trichoderma spp.* por su capacidad para contener a las especies antagonistas más relevantes, y controlar un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola, entre ellas el cultivo de la fresa.

1.1 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años el uso irracional de agroquímicos para controlar enfermedades presentes en los cultivos agrícolas ha generado diversas problemáticas ecológicas, económicas y de salud pública, desafortunadamente en México aún prevalece su utilización, siendo los cultivos más afectados aquellos que suelen consumirse en fresco, como es el caso de la fresa. A esto se suma lo delicado de su cultivo y las exigencias en el manejo técnico previo y durante su producción, por esta razón resulta necesario identificar de manera precisa a los agentes bióticos involucrados en el desarrollo de las enfermedades más relevantes presentes en su ciclo de producción como es el caso de *Neurospora dictyophora*, y con ello proponer un control eficiente. El uso de *Trichoderma harzianum* como un agente de biocontrol para diversas enfermedades fúngicas en cultivos de importancia agrícola está cada vez más aceptado y comprobado, por tal motivo el presente trabajo plantea evaluar la efectividad de *Trichoderma harzianum* sobre *Neurospora dictyophora*, y contrastarlos con fungicidas químicos, para con ello proporcionar nueva información que promuevan métodos alternativos para el control de la enfermedad, de menor impacto al ambiente y a la salud humana.

II. HIPÓTESIS

2.1 *Trichoderma harzianum* inhibirá el desarrollo de *Neurospora dicthyophora*.

2.2 El antagonismo del filtrado de *Trichoderma harzianum* será superior al antagonismo de los fungicidas químicos (benomilo y captan).

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre *Neurospora dictyophora* en fresa *(Fragaria ananassa) in vivo* e *in vitro*.

Objetivos específicos

- Caracterización de *Neurospora dictyophora* como agente patógeno en los frutos.
- Determinar la efectividad antagónica in vivo e in vitro del tratamiento biológico con la cepa THt4 de la cepa *Trichoderma* sp. contrastado con dos tratamientos químicos basados en fungicidas comerciales sobre el crecimiento de *Neurospora* sp.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

Se utilizaron las cepas MA_Nd20(cb9) de *N. dictyophora* con número de acceso MW520112.1 en *Genebank* y la cepa THt4 de *Trichoderma harzianum* con numero de acceso MH127469 en *Genebank*. Las cepas fúngicas fueron proporcionadas por el laboratorio de hongos y patología vegetal del Eco-Campus, Valsequillo del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), ubicado en Independencia O 2 Sur No.50, San Pedro Zacachimalpa, Puebla.

4.2 Análisis de secuencia y filogenia

La secuencia se analizó y alineo con la base de datos del GenBank quien es parte de International Nucleotide Sequence Database Collaboration, que está integrada por la base de datos de ADN de Japón (DNA DataBank of Japan (DDBJ)), el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Molecular Biology Laboratory (EMBL)), y GenBank en el National Center for Biotechnology Information. La filogenia se realizó con el software MEGA X (Kumar *et al.* 2018).

Tabla 1. Secuencias del Gen-bank empleadas para corroborar la identidad de nuestro hongo.

Especie	Cepa	Fuente de aislamiento	País	Número de acceso Genebanck		nucleótidos analizados
				ITS	TEF _1	
Neurospora dictyophora	MA_Nd20(cb9)	Fresa	México	MW520112.1	-	503
	FC-3662	Haya-japonesa	Japón	LC206595.0	-	
	CBS 656.70	Colección	Holanda	MH859888.1	-	
	CBS 656.74	Colección	Holanda	MH860885.1	-	
	CBS 529.95	Colección	Estados Unidos	MH862538.1	-	
	CBS 275.50	Colección	Holanda	MH856623.1	-	
	CCTU A145	Encino	Alemania	MK886745.1	-	
	CBS 529.95	Colección	Holanda	MH862539.1	-	
	WH92	Zarzamora	Estados Unidos	MN718948.1	-	
	FGSC7221	Desconocido	Suecia	HF5976499.1	-	
	KoRLI047144	Liquen	República de Corea	MN341354.1	-	
	CBS 592.69	Colección	Holanda	MH859381.1	-	
	KoRLI047142	Liquen	República de Corea	MN341355.1	-	

4.3 Tasa de desarrollo micelial y velocidad de crecimiento

Para la evaluación del desarrollo micelial se utilizó la metodología de Miguel-Ferrer *et al.* 2021, que consistió en sembrar fragmentos de 5 mm de diámetro de *T. harzianum* y *N. dictyophora* en cajas Petri con PDA (Agar de Papa y Dextrosa), cada uno por triplicado y se incubaron en condiciones de oscuridad a 27± 2 °C por 7 días. Se midió el radio micelial cada 24 h para estimar la velocidad de crecimiento (mm/hora), el radio micelial se determinó con un vernier digital (CD-6 Mitutoyo) tomando la misma dirección por triplicado. La toma de lectura del radio se hizo en base a el crecimiento del frente de la hifa por el reverso de la placa Petri desde el borde del inóculo hasta la punta del micelio García-Espejo *et al.*, 2016.

Además, se calculó la TD con la fórmula propuesta por Romero *et al.*, (2018). Se registró el crecimiento (radio en cm) de los aislados cada 24 horas, se tomaron 2 puntos de la curva de desarrollo micelial para usarlos en la formula:

$$TD = \frac{RCf - RCi}{T}$$

- TD = tasa de desarrollo
- RCf = es el radio final en cm.
- RCi = es el radio inicial en cm.
- T = es el tiempo de incubación en días

4.4 Prueba de patogenicidad

Se utilizó la técnica de cultivos duales de Cherif y Benhamou (1990). En cajas Petri con PDA, para cada tratamiento se depositó en un extremo de la caja un disco de cinco mm de diámetro con micelio activo de *Neurospora dictyophora* de 10 días de edad. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se depositó un disco de cinco mm de *Trichoderma spp.*, con micelio activo de colonias de 10 días de edad.

Se tomaron lecturas cada 24 horas para determinar el número de días al primer contacto entre las hifas del antagonista y el fitopatógeno, así como el comportamiento en general, midiendo el crecimiento de ambas colonias y el diámetro de la zona de traslape (Aceves, *et al.*, 2013).

Se midió el diámetro de la colonia en dos direcciones, en la mayor y menor longitud y el crecimiento micelial (CM) se obtuvo como el promedio de los valores en las dos direcciones.

La competencia por nutrientes y espacio se valoró comparando la velocidad del crecimiento, para esto, se midieron los radios de crecimiento del patógeno (RCP) y de los antagonistas (RCA) con la ayuda de un calibrador "Pie de rey" según recomienda (Suárez *et al.*, 2008). Conjuntamente, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de (Ezziyyani *et al.*, 2004):

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

- PICR = porcentaje de inhibición de crecimiento radial.
- R_1 = radio (mm) del patógeno testigo.
- R_2 = radio (mm) del patógeno en enfrentamiento.

Para evaluar el antagonismo se utilizó la escala de Bell *et al.*, (1982), la cual consta de cinco niveles:

Tabla 2: *escalas usadas para la clasificación de los antagonistas.*

Clase	Características	Características
I	Crecimiento de *Trichoderma spp.*, que cubrió toda la superficie del medio y redujo el crecimiento micelial del patógeno.	Mutuamente entrelazado
II	Crecimiento de *Trichoderma spp.*, que cubrió al menos 2/3 partes del medio.	Sobrepuestos
III	*Trichoderma spp.*, y fitopatógeno crecieron ½ y ½ la superficie del medio, uno no se sobrepuso al otro.	Inhibición leve
IV	Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de *Trichoderma spp.*	Crecimiento alrededor
V	Crecimiento del patógeno que cubrió toda la superficie del medio.	Inhibición a distancia

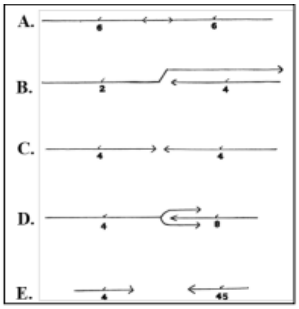

Figura 1: Tipos de Inhibición determinada por Porter, (1923). **A.** mutuamente entrelazados, **B.** sobrepuestos, **C.** inhibición leve, **D.** crecimiento alrededor **E.** inhibición a distancia.

4.5 Postulados De Koch

Siguiendo la metodología de (Fraire-Cordero *et al.*, 2003), se seleccionaron 10 fresas que se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 5 min, se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril. Se colocaron en dos recipientes previamente esterilizados en la campana de flujo laminar con luz UVc durante 20 min evitando el contacto entre ellos. En cada recipiente se colocaron sanitas y un algodón en cada esquina humedecido con agua destilada, esto con el fin de crear una cámara húmeda mismo que mantuvo en el laboratorio a temperatura ambiente, con cinco fresas cada recipiente, cinco fueron inoculadas con *N. dictyophora*. Se hizo una herida mecánica en los frutos con una punta micológica de acero previamente esterilizada, posteriormente con la misma punta se recolecto micelio de *N. dictyophora* de una caja Petri y se procedió a inocular al grupo seleccionado. Cada 24 h se observó la presencia del hongo y sus síntomas.

4.6 Solidos solubles totales (SST)

De acuerdo con el protocolo de calidad de SENASA (Resolución N°85/98) establece que las frutillas para ser comercializadas deben tener un estado de madurez determinado por el color y el contenido de azucares. El color debe ser el rojo característico de la variedad y cubre como mínimo el 75% de la superficie del fruto, sin presencia de punta verde,

determinado visualmente. Por otro lado, el contenido de SST (sólidos solubles totales) expresados en grados Brix debe ser ≥7°Bx Solórzano *et al.*, (2015). Sin embargo, estas características se pueden ver totalmente afectadas por la presencia de algún fitopatógeno, con ayuda de un refractómetro Mano 0-53% MASTER53M se determinará el contenido de SST de los frutos sanos y enfermos.

4.7 Medios líquidos para *Trichoderma harzianum*

Para determinar el medio de cultivo liquido óptimo de *Trichoderma harzianum* se realizó una prueba de contraste con distintas fórmulas de composición del medio como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1: Medios líquidos de inoculados con *T. harzianum.*

Tratamiento N°	Código	Composición
1	T_3	2.5 g Malta + 125 mL H_2O + 0.5 mL $C_6H_{12}O_6$ + *T. h*
2	T_2	125 mL H_2O + 0.5 mL $C_6H_{12}O_6$ + *T. h*
3	T_1	125 mL de H_2O + *T. h*
4	T_t	125 mL de H_2O

Otra manera por la cual se evaluó la interacción fue por medio de antibiogramas para lo cual se hicieron sensidiscos con papel filtro whatman con un diámetro estándar de 0.5 mm, se depositaron 10 sensidiscos en cada tubo de ensayo, con ayuda de la autoclave se esterilizaron, esto con la finalidad de verter el medio líquido ya filtrado del T_t, T_1, T_2 y T_3.

Bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar se realizó la siembra, se depositará por placa cuatro discos de 0.5 mm de diámetro de medio PDA con micelio de *Neurospora dictyophora* con 15 días de antigüedad. Finalmente, en el centro de la placa se depositó un sensidisco de cada filtrado con cuatro repeticiones por tratamiento, este procedimiento se replicó con dos tratamientos químicos ver la tabla 3, esto con la finalidad de medir el antagonismo de cada uno.

Cuadro 2: Benomyl 50 y captan 50, se evaluó la dosis comercial autorizada por la fabricante expresada en mg L^{-1}.

Fungicida (Nombre comercial)	**Ingrediente activo**	**Formula molecular**
Captan 50	Captan	$C_9H_8C_{I3}NO_2S$
Benomyl 50	Benomyl	$C_{14}H_{18}N_4O_3$

4.8 Determinación de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales se utilizó el método de Biuret (Quiroga-Flores 2011).

1. Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Biuret
2. Se realizo una solución con la albumina de suero bovino (10mg/ml). Para esta se pesó 1g de tejido, se homogenizo en 9ml de solución salina, y luego se centrifugo a una velocidad máxima por 5min, para tomar el sobrenadante que fue el suero que utilizamos.
3. Se colocaron en una gradilla 8 tubos de ensayos limpios y secos.
4. Los tubos de ensayos fueron numerados del uno al seis con un rotulador permanente, así como también los muestras problemas
5. Seguidamente con las pipetas se adiciono cada uno de los volúmenes de la disolución patrón de albumina de huevo al 10mg/ml y de agua destilada, posteriormente se agregaron los reactivos en el siguiente orden: albumina, agua destilada, solución alcalina o biuret.
6. ¿Cada uno de los tubos se agito suavemente y se dejaron reposar durante un periodo máximo de 20 minutos, luego se procedió a medir en el espectrofotómetro en la longitud de onda de 540 nm ajustando el cero de absorbancia con él? con la solución blanco-exenta de proteínas (tubo 1).
7. A continuación, se midieron la absorbancia de los tubos 2 a 6, luego se procedió a medir la concentración de la muestra problema (tubo 7).

Cuadro 3: La curva de calibración, método se realizó con Albumina de huevo preparando estándares de concentraciones de 1 a 10 g/mL Selva (2016).

Tubo	Albumina		H_2O	Reactivo de Biuret	Absorbancia
	mL		(mL)		(A)
	2.50%	Muestra problema		mL	mL
1B	0		1	4	0.17
2S	1		0	4	0.06
3S	0.8		0.2	4	0.047
4S	0.6		0.4	4	0.037
5S	0.4		0.6	4	0.032
6(H_2O)	-	1	0	4	0.02
7(Malta)	-		0	4	0.048
8(Glucosa)	-		0	4	0.031

4.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS Statistics versión 25. Las variables analizadas en el estudio fueron: La TD (tasa de desarrollo), la VC (velocidad de crecimiento) y el PICR (porcentaje de inhibición de crecimiento radial). La

comparación de medias se hizo por medio de un ANOVA donde se le agrego la prueba post-hoc de Tukey-Kramer con una probabilidad $p \leq 0,05$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización e identificación de *Neurospora dictyophora*

La identificación de colonia fúngica asociada a *Neurospora dictyophora* se realizó mediante la observación de estructuras reproductivas al microscopio, comparando las características (textura, tipo de micelio, color, tipo de hifas) descritas por Morales *et al.*, (2020). Para la observación microscópica se utilizaron cultivos de PDA, se observaron después de diez días de incubación a 28 °C, la morfología microscópica del hongo se examinó bajo un microscopio óptico.

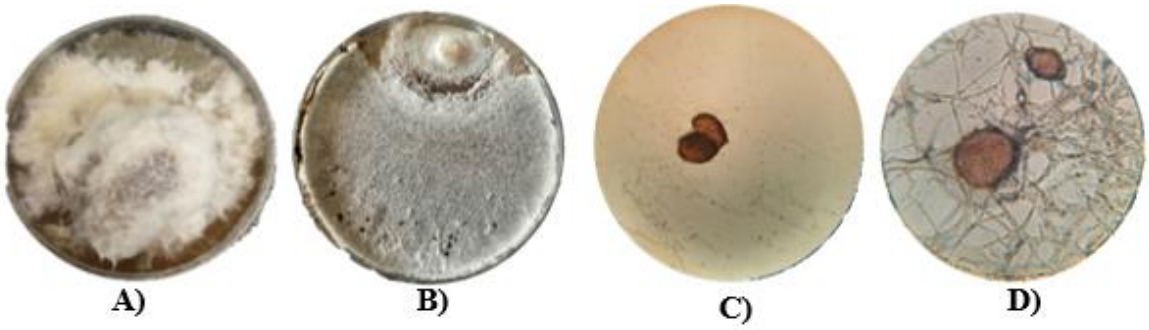

Figura 2. Morfología de la cepa MA_Nd20(cb9). A) Micelio de *Neurospora* creciendo sobre una fresa, B) Aspecto de la colonia creciendo en medio PDA, C) Peritecios vistos a 4x, D) Peritecios vistos a 10x con presencia de hifas.

La identificación de este patógeno es el primer paso importante para desarrollar estrategias de manejo para el control de esta enfermedad.

5.2 Filogenia

La secuencia correspondiente a la cepa MA_Nd20(cb9) mostraro un porcentaje de identidad de 100 y 97.11 % con regiones de ITS 1-2 (MW520112.1) y TEF-1α (FR774348.1) correspondientes a la especie *Neurospora dictyophora*. Posteriormente, la secuencia se analizó mediante el software Mega X, para ser concatenado y así obtener un árbol filogenético.

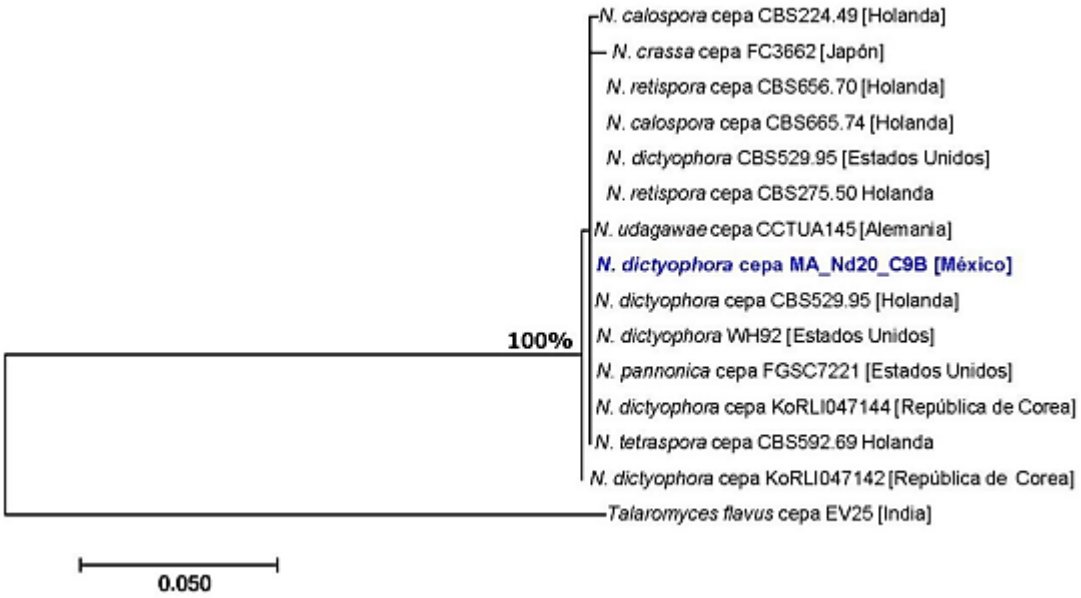

Figura 3. Filogenia de *Neurospora dictyophora*. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético generado a partir de secuencias ITS. *Talaromyces flavus* se utilizó como grupo externo. La cepa MA-Nd20(c9b) obtenidas en este estudio se muestran en azul.

5.3 Postulados de Koch

Las pruebas de patogenicidad para *Neurospora dictyophora* sobre frutos de fresa dieron como resultado positivo a los agentes causales de la pudrición blanda en frutos maduros, los síntomas y signos de la enfermedad se presentaron similitudes a los descritos por Morales *et al.*, (2020). Los frutos dañados presentan un ligero hundimiento sobre la lesión en la cual se inoculo, el micelio se observa a partir de las 24 horas con un color blanco, a los 15 días la fruta queda completamente cubierta con el micelio tomando un color rojo-oxido, las frutas control no mostraron síntomas de la enfermedad. Los resultados mostraron que *Neurospora dictyophora* puede fungir como patógeno de los frutos de fresa, su desarrollo se ve influenciado por condiciones de humedad y temperatura no menores a los 30° C con presencia de lesiones en el fruto.

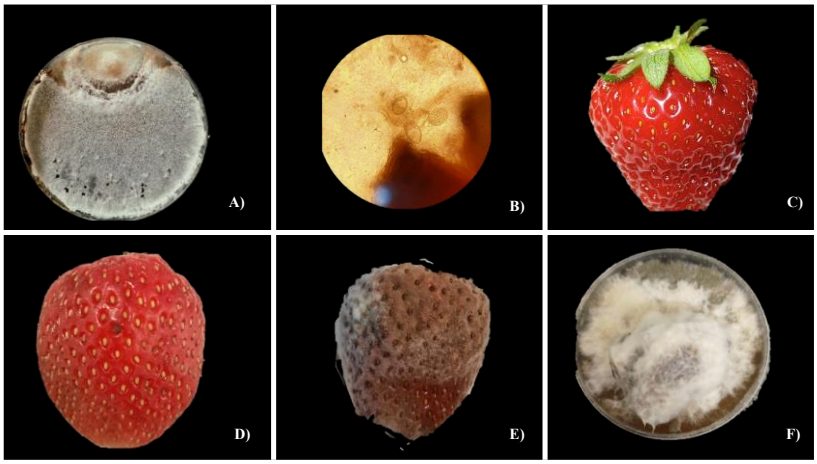

Figura 4. Prueba de patogenicidad. A) Cepa de *N. dictyophora* creciendo en medio PDA, B) C) Fresa del grupo control, D) Fresa inoculada con micelio de *N. dictyophora*, E) Fresa con 5 días de inoculación, F) Fresa con 15 días de inoculación.

5.4 Sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales (SST) mostraron diferencias significativas entre las fresas sanas y las enfermas respectivamente (figura 4). Los frutos enfermos obtuvieron un valor de 4° Brix y los sanos mostraron un valor significativamente mayor con 8° Brix, mismo que se justifica debido a que la fresa tiende a incrementar la cantidad de SST durante la maduración del fruto Salamat *et al.*, (2013).

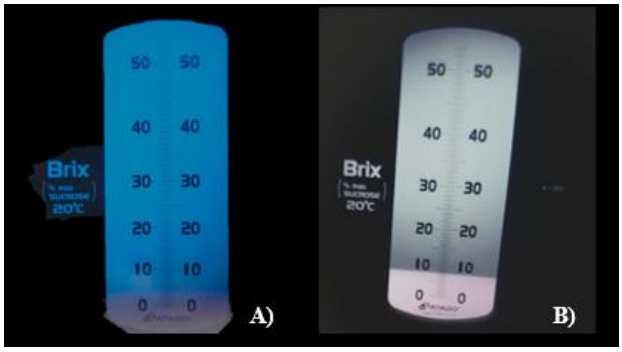

Figura 5. Resultados observados por un refractómetro Mano 0-53% MASTER53M**.** A) grados Brix de un afresa enferma y B) grados Brix de una fresa sana.

5.5 Velocidad de crecimiento (VC) y tasa de desarrollo (TD)

Tras el análisis y comparación de la VC y la TD (figura 7) del agente de control biológico (*T. harzianum* THT4) y el agente patógeno de postcosecha de la frutilla (*N. dictyophora* MA_Nd20) se presentó una superioridad en el promedio de la variable TD de MA_Nd20 sobre Tht4, siendo los valores medios de TD; 0.57 y 0.38 cm/día para *T. harzianum* y *N. dictyophora* respectivamente. Tomado los puntos RCF (radio de crecimiento final) del día 6 y RCi (radio de crecimiento inicial) del día 2 y T (tiempo) del día 6. En cuanto a la VC se

mostró una superioridad en el valor promedio de la cepa THT4 de *T. harzianum* sobre MA_Nd20 de *N. dictyophora*, siendo los valores: 34 y 15 mm/hora respectivamente, obtenidos de la fórmula de velocidad a partir de la curva de la cinética de crecimiento de cada hongo respectivamente.

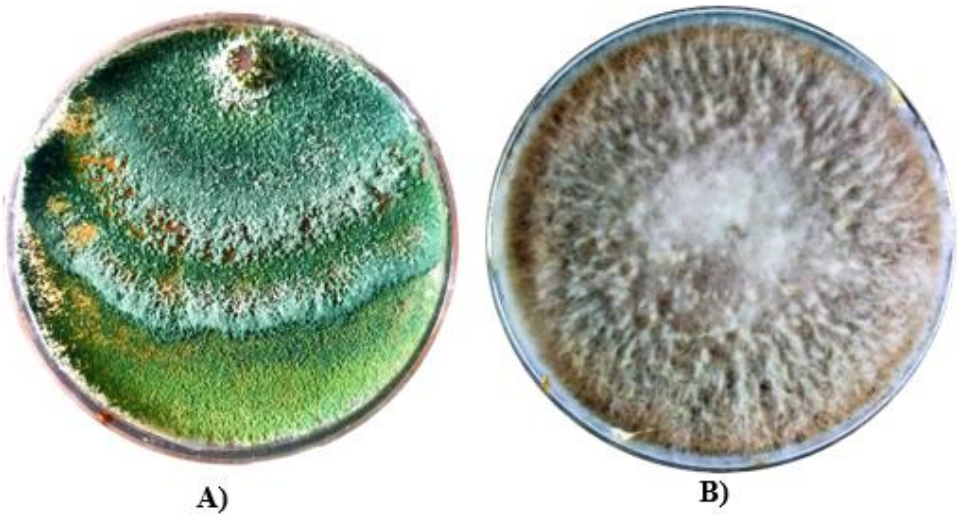

Figura 6. Observación de las colonias. A) colonia de *Trihoderma harzianum* creciendo en medio PDA y B) Colonia de *Neurospora dictyophora* creciendo en medio PDA.

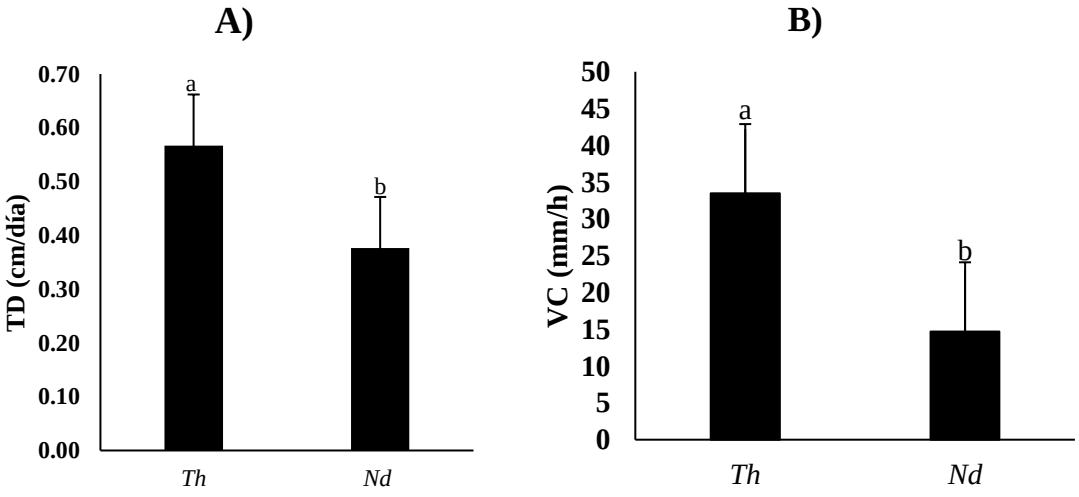

Figura 7. Tasa de desarrollo micelial (A) en comparación de la velocidad de crecimiento (B) promedio de *T. harzianum* y *N. dictyophora* durante 7 días de incubación en medio PDA a 30 °C.

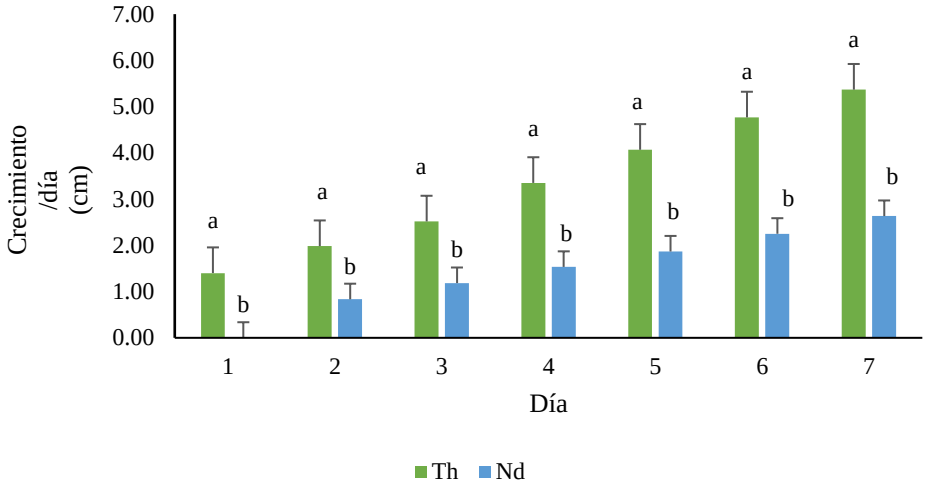

Figura 8. En la gráfica se muestra el ritmo de crecimiento de *Trichoderma harzianum (Th)* y *Neurospora dictyophora (Nd)* por día, dicho crecimiento es de manera ascendente en ambos hongos, sin embargo, (*Th)* tiene un mayor aumento que (*Nd)*.

5.6 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Guigón *et al.*, (2010) describió que la reducción en la tasa de crecimiento de los hongos en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum*, se logro observar parasitismo para todos los casos. En un estudio realizado por Morales (2022) al estudiar a *Trichoderma harzianum* sobre *Neurospora dictyophora* obtuvieron una clasificación antagonista en los niveles 3 y 5, es decir que se considera deficiente

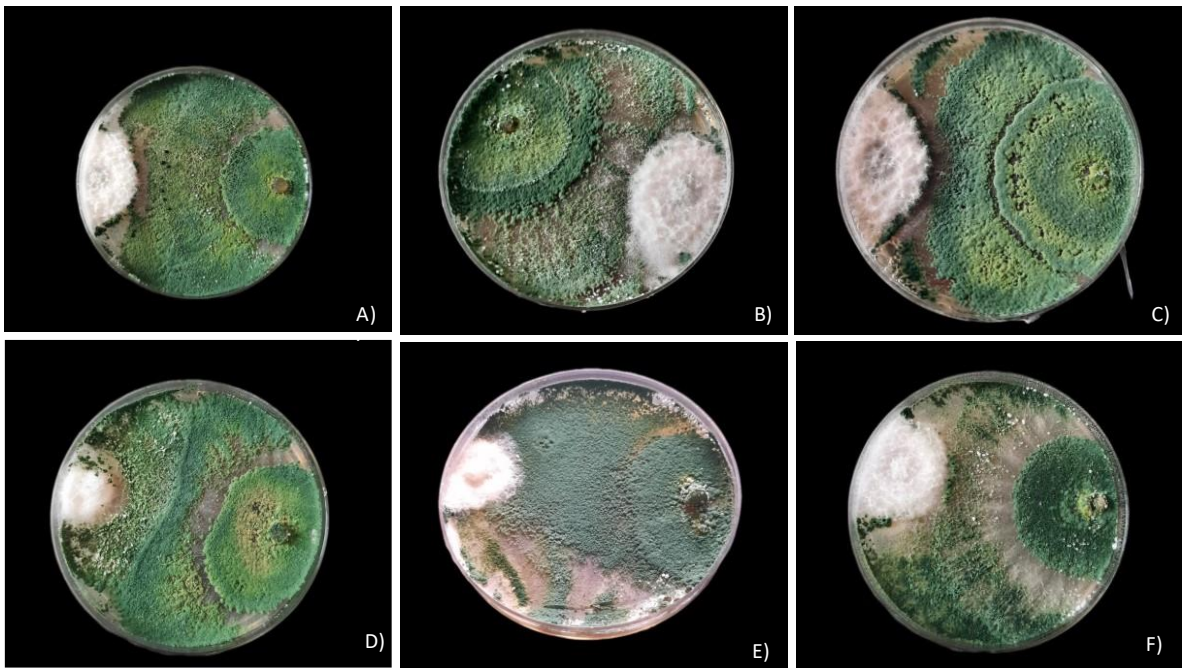

Figura 9. Antagonismo de la cepa T-H4 de *Tricohoderma harzianum* de acuerdo con la escala de Bell *et al*., (1982) y *Neurospora dictyophora*.

Antagonismo de *Trichoderma harzianum* con *Neurospora dictyophora* en escala de Bell *et al.* (1982), a las 168 horas en cajas con medio PDA, incubados a 28 °C por 7 días, de acuerdo con la escala el antagonismo es de clase I para todas las cepas, esto significa que el agente de control biológico inhibe de manera eficiente al fitopatógeno. De acuerdo con nuestros resultados obtuvimos un PICR de 61.94 %, según lo reportado por García *et al.*, (2016) *Trichoderma harzianum* inhibe el crecimiento del patógeno debido a la producción de compuestos, es decir metabolitos volátiles y no volátiles entre los cuales se encuentran pirones, isocianatos, pépticos y trichocinas; además, la producción de enzimas extracelulares difundibles tales como pectinasas, cutinasas, glucanasas y quitinasas.

5.7 Antibiogramas

La tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento presentaron diferencias estadísticas significativas entre ambos hongos. Mismo resultado que se respalda al observar la figura 9, donde se presentan los alos de inhibición a los 7 días de confrontación. Los resultados mostraron que el tratamiento 1 (125 ml de H2O + *T. harzianum*) mostro el menor crecimiento del fitopatógeno seguido de Benomyl, resultados que se logra apreciar en la figura 8. El PICR para el tratamiento 1 fue del 79.18 % de inhibición seguido de benomyl con un 49.89 % de inhibición.

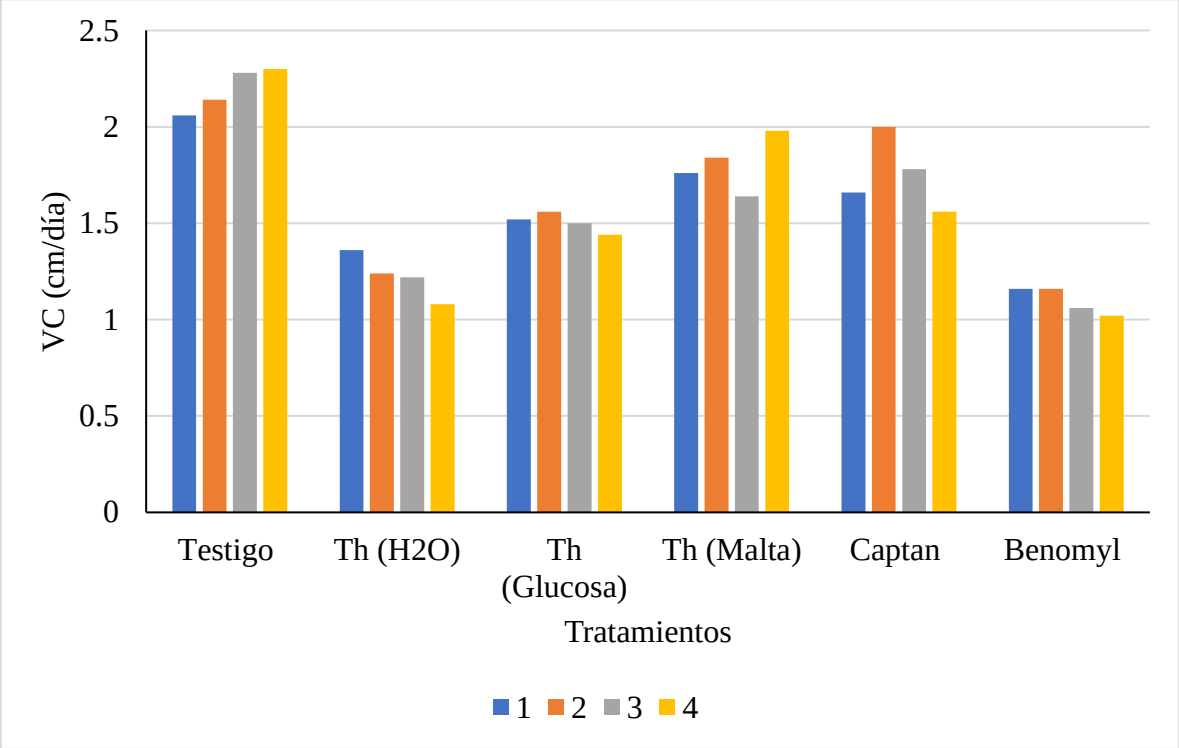

Figura 10. Se muestran una gráfica que ilustra el comportamiento del crecimiento de *Neurospora dictyophora* por día y por tratamiento.

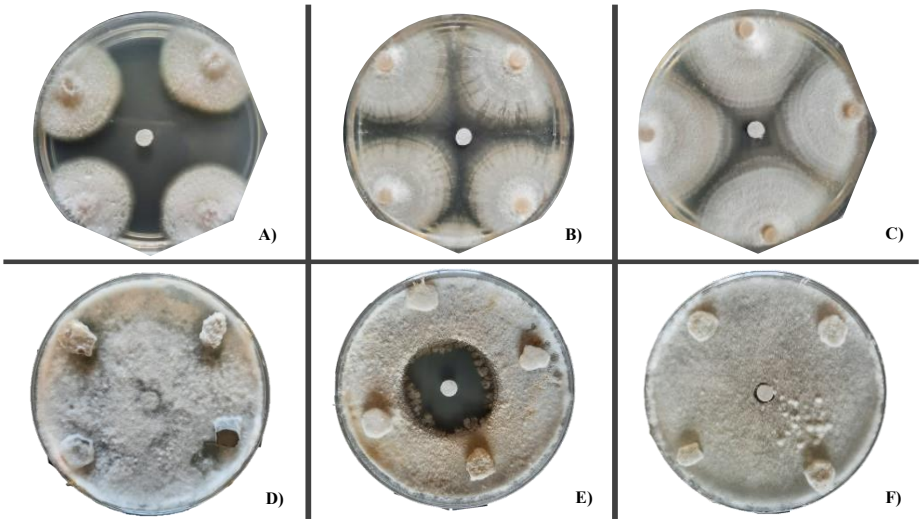

Figura 11. Sensidiscos impregnados con tres diferentes medios de *Trichoderma harzianum*, sensidiscos impregnados con dos fungicidas y un tratamiento testigo, A) Tratamiento 1, B) Tratamiento 2, C) Tratamiento 3, D) Tratamiento testigo, E) Benomyl y F) Captan.

5.8 Determinación de proteínas totales

Se cuantifico el porcentaje de proteína solo para los tres filtrados de *Trichoderma harzianum* con diferentes medios líquidos.

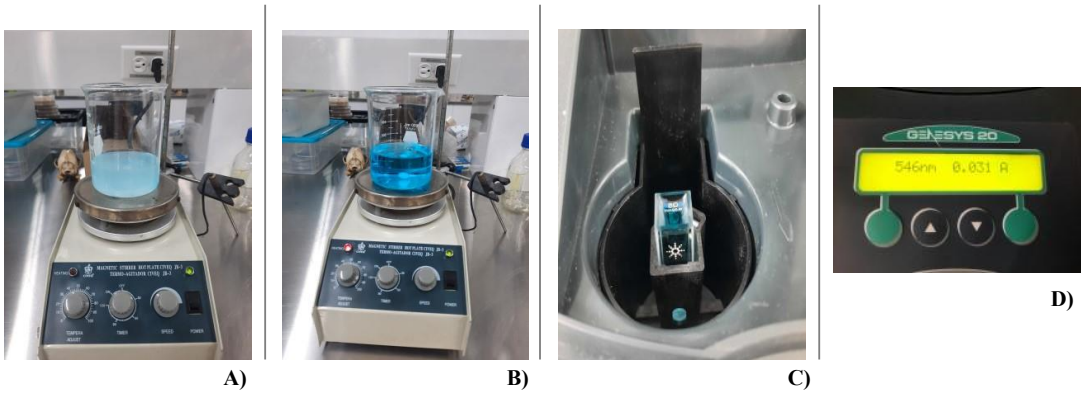

Figura 12. Preparación del reactivo de biuret, A) Termo-agitador disolviendo el reactivo de biuret, B) Reactivo de Biuret listo para usarse, C) Cubeta de cuarzo con la muestra problema dentro de la cámara del espectrofotómetro y C) Calibración del espectrofotómetro.

En la cuantificación de proteínas utilizando el reactivo de Biuret, las muestras que contenían albumina de huevo cambiaron ligeramente su color a violeta, esto se debe a la presencia de proteínas, lo que corrobora que a mayor absorbancia mayor concentración de proteínas. Los resultados obtenidos muestran que el Tratamiento 1 obtuvo una contracción

de 0.138% de proteína, el tratamiento 2 una concentración de 0.85% de proteína y para el tratamiento 3 fue de 0.44% de proteína.

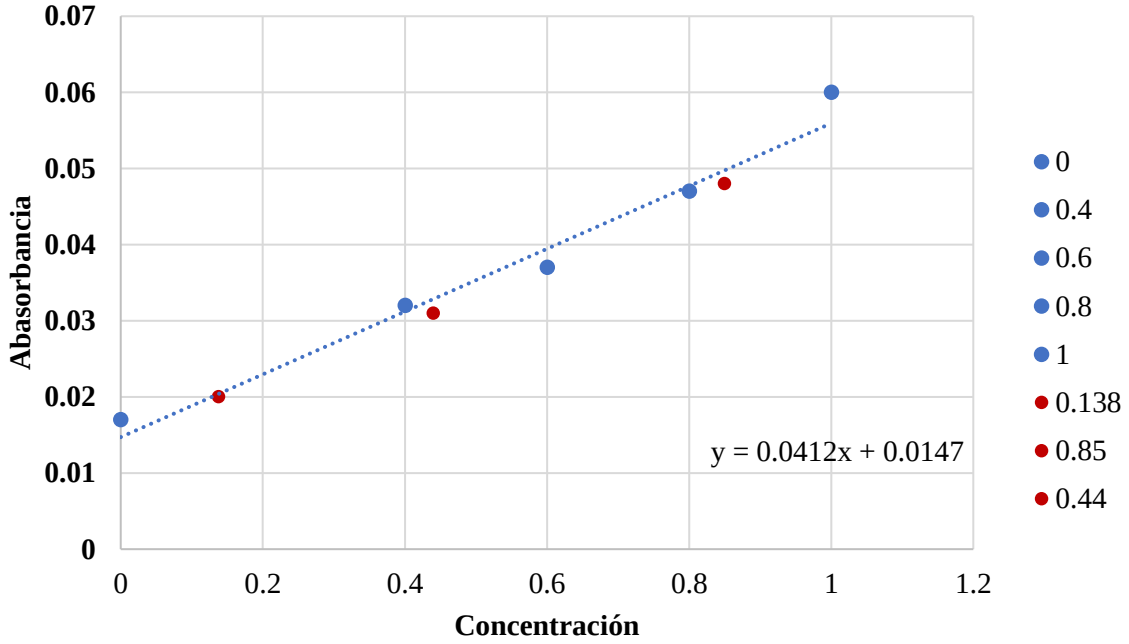

Figura 13. Muestra la gráfica de medición de absorbancia y concentración de proteínas utilizando el método de Biuret.

La grafica anterior muestra la línea de tendencia de la absorbancia y la concentración, la ecuación de la recta se encuentra en la parte inferior derecha, la cual demuestra que la línea de tendencia predice de buena manera la secuencia de puntos. La relación de la concentración con la absorbancia demuestra que hubo una buena relación entre la concentración de proteínas (Redmile *et al.*, 2013), lo cual se justifica con el cambio de coloración de las muestras, que pasaron de un azul a violeta. Se sabe que la albúmina de huevo tiene 6 residuos de arginina, 25 de lisina y 8 de histidina (NCBI, 2015), los cuales como ya se comentó, son los que se unen al tinte azul de Comassie, esto quiere decir que la albúmina es buena opción para producir curvas de calibración confiables, según (Bradford, 1976) la albúmina no genera variabilidad significativa en las lecturas.

VI. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación corroboraron que *Neurospora dictyophora* es el agente causal de la pudrición blanda en los frutos de fresa, las pruebas de patogenicidad arrojaron que la *Trichoderma harzianum* si inhibe el crecimiento de *Neurospora dictyophora*. Para el caso de los tratamientos con fungicidas se concluyó que estos inducen un mayor crecimiento del patógeno, situación que es alarmante debido al uso de estos agroquímicos en el campo agrícola.

Es importante mencionar que *Neurospora dictyophora* al ser una especie nueva, nos brinda la posibilidad de buscar nuevas alternativas en el campo de la investigación científica, haciendo un énfasis en la fitopatología vegetal, sin descartar que también se podrían buscar otros usos para esta especie.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abd-Elgawad, M.M.M.; Elshahawy, I.E.; Abd-El-Kareem, F. Eficacia de la solarización del suelo en la enfermedad de la podredumbre de la raíz negra y especulación sobre su influencia en nematodos y malezas de fresa en Egipto. *Bol.* 2019, *43*, 175.

Abril-Díaz, N., Bárcena Ruiz. J. A., Fernández-Reyes. E., Galván-Cejudo. A., Jorrín-Novo. J., Peinado-Peinado. J., Meléndez-Valdés. F. T., Túnez-Fiñana, I**.** Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.

Aceves, A. C. M., Sánchez, M. A. O., Flores, R. A., Barrios, A. A., Cruz, N. A. 2013. Eficiencia biológica de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, en el control de *Sclerotium rolfsii Sacc.*, en cacahuate. Avances en Investigación Agropecuaria. Vol.

Agamez, R. E. Y., Zapata, N. R. I., Oviedo, Z. L. E y Barrera, V. J. L. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp*. Revista Colombiana de Biotecnología, vol. X, núm. 2, pp. 23-34.

APS. 2011. The American Phytopatho- logical Society. Coffee rust *(Hemileia vastatrix)* :http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx. Fecha de consulta: 25 de enero de 2013.

Argumedo, D. R., Alarcón, A., Ferrera, C. R y Peña, C. J. J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista internacional de contaminación ambiental, vol.25 no.4.

Ather-uz-Zaman., Al-Khayri, J., y Islam, R. 2018. Mejoramiento genético de la fresa (Fragaria x ananasa Duchense). Advances in Plant Strategies: Fruits. Springer, Chan, 217-275.doi: https://doi.or/10.1007/978-3-319-91944-7_6.

Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderac P, Anzueto F, Hruska AJ and Morales C. 2015. The Coffee rust crisis in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. Food Security 7: 303-321. https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9.

Bailey LH (1894) De donde vino la fresa cultivada. Bot Gaz 28(328):293–306

Barros ST, Oliveira TN, Bastos T G and Maia CL.1999. Hyperparasitism of *Cladosporium uredinicola* over *Puccinia puta* on the host Ipomoea fistulosa. Mycologist 13:23-24. https://doi.org/10.1016/S0269-915X(99)80071-8.

Bell, D. K.,WelD. H. D., & Markham, C. R. (1982).In vitro antagonism of Trichodermaspecies against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 72(4),379-382.https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379

Binard, P. (2016). Evolution of the world strawberries market: focus on Europe. Paper presented at the 8th international strawberry symposium, Quebec City, Canada, 13–17.

Boosalis, M. G. 1964. Hyperparasitism. Annual Review of Phytopathology 2:363-376. https://doi.org/10.1146/annu-rev.py.02.090164.002051.

Both terms namely pathogenicity and virulence describe the interaction of a pathogenic agent with a host (normally a macro-organism). In everyday language they are often used interchangeably, although it is felt that there might be a difference.

Cai, Z., Yang, R., Xiao, H., Qin, X y Si, L. 2015. Efecto de la aplicación previa a la cosecha de Hanseniaspora uvarum sobre enfermedaes poscosecha en fresas. Postharvest Biology and Technology, 52-58. Doi: doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.004.

Cano, T. M. A. 2013. Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria spp*.). REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS. Vol. 7 - No. 2 - pp. 263-276.

Centro de Estudio para el Desarrollo rural sustentable y la soberanía agroalimentaria (CEDRSSA). 2018. El café en México diagnóstico y perspectiva. Palacio Legislativo de San Lázaro.

Chen, J. L., S. Z., Sun, C. P., Miao, K., W, Y.W., Chen, L. H. 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. Journal of Ginseng Research 40:315-324.

Chordi, S. 2013. Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de luz de alta intensidad. Tesis. Facultad de Medicina, Universidad de Lleida, España. 45 p.

Doehlemann G, Ökmen B, Zhu W, Sharon A. Plant Pathogenic Fungi. Microbiol Spectr. 2017 Jan;5(1). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016. PMID: 28155813.

Ezziyyani, M., Perez, S. C., Sid, A. A., Raquena, M. E y Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento *(Capsicum annuum L.).* Anales de Biología 26: 35-45.

Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Sid, A. A., Requena, M. E., Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento *(Capsicum annuum L.)*. Anales de Biología 26: 35-45.

FAOSTAT. 2019. The statistics division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/S. [Links]

Fernández, B. R. J y Suárez, M. C. L. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum rifai* sobre *Fusarium oxysporum schlecht F. sp passiflorae* en maracuyá *(Passiflora edulis sims var. flavicarpa)* del municipio Zona Bananera Colombiana. Rev.Fac. Nal.Agr.Medellín 62(1): 4743-4748.

Fernández-Barbosa, R. J., Suárez-Meza, C. L. 2009. ANTAGONISMO IN VITRO DE Trichoderma harzianum Rifai SOBRE Fusarium oxysporum Schlecht f. sp passiflorae EN MARACUYÁ (Passiflora edulis Sims var. Flavicarpa) DEL MUNICIPIO ZONA BANANERA COLOMBIANA. Rev.Fac. Nal.Agr.Medellín 62(1): 4743-4748.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). (2016). Panorama Agroalimentario: Café 2016 [en línea].

Fraire-Cordero, M. L., Yáñez-Morales, M. J., Nieto-Ángel, D y Vázquez-Gálvez, G. 2003. Hongos Patógenos en Fruto de Fresa *(Fragaria x ananassa* Duch.*)* en Postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21:285-291.

Fraire-Cordero, M. L., Yáñez-Morales, M. J., Nieto-Ángel, D. 2003. Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) en Postcosecha. Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA.

García-Espejo Cielo Noemí, Mamani-Mamani Marisel Mercedes, Chávez-Lizárraga Georgina Aurelia1, Álvarez-Aliaga María Teresa. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del Trichoderma inhamatum (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. J. Selva Andina Res. Soc. 7(1):20-32.

Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, JM, Quiles, JL, Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). La fresa: Composición, calidad nutricional e impacto en la salud humana. Nutrición, 28(1), 9–19. https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009.

Gómez-De la Cruz, I., Pérez-Porrilla, E., Martínez-Bolaños, M., Carrión-Villarnovo, G. L. L., Hernández-Leal, T. I. 2018. Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). Rev. mex. fitopatol vol.36.

Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Roucco M, Lanzuise S, Woo S, Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de Trichoderma spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28(2): 87-96. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61218468002.

Harman, G. 2000. Myths and Dogmas of Biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on Trichoderma harzinum T-22. Plant Disease. 84(4):377-393.

Hermosa, M. R., Grondona, J. M., Díaz, E. A., Iturriaga and E. Monte. 2001. Development of a strain-specif SCAR marker for the detection of Trichoderma atroviride 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Current Genetics 38(6): 343-350.

Hernández, M. D. J., Ferrera, C. R y Alarcon, A. 2019. *Trichoderma:* Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean journal of agricultural & animal sciences, vol.35 no.1.

Howell, C. 2006. Understanding the Mechanisms Employed by Trichoderma virens to Effect Biological Control of Cotton Diseases. Phytopathology. 96(2):178-180.

Infante, D., Martinez, B., Gonzalez, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. Revista de protección vegetal. 24:14-21.

Infante. D., Martínez. B., González. N y Reyes. Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. v.24 n.1 La Habana.

Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Huitzilán de Serdán, Puebla. pp. Recuperado de http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21078.pdf

J. Selva Andina. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. Res. Soc. vol.7 no.1 La Paz.

J. Popp, K. Pető , J. Nagy. 2012. Productividad de plaguicidas y seguridad alimentaria: una revisión. Agron. Sostener. desarrollo , 33 (2012) , págs. 243 - 255 , 10.1007/s13593-012-0105-x

Khoshnevisan, B., Rafiee, S. y Mousazadeh, H. (2013). Evaluación de impacto ambiental de la producción de fresas en campo abierto e invernadero. Revista Europea de Agronomía, 50, 29–37. https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.05.003.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. Mol. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Biol Evol. 1;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096

Kupper, C. K., Gimenes, F. N y Goes, A. 2003. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Fitopatologia Brasileira. vol.28 no.3.

López, F. C. U., Brito, V. H., López, M. D., Salaya, D. J. M y Gómez, M. E. 2017. Papel de *Trichoderma* en los sistemas agroforestalescacaotal como un agente antagónico. Tropical and Subtropical Agroecosystems, vol. 20, núm. 1.

Luis Roberto Pérez-Rodríguez., Luis Pérez-Moreno., Rafael Guzmán-Mendoza., Diana Sanzón-Gómez., José Roberto Belmonte-Vargas. 2019. Sensibilidad in vitro de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en fresa a controladores biológicos y fungicidas, en el estado de Guanajuato, México. Acta univ vol.29 México. Epub 11-Sep-2020 https://doi.org/10.15174/au.2019.2339

Mahmud, S., Zaman, Q., Esau, T., Price, Gy Prithiviraj, B. 2019. Desarrollo de un sistema de condición de iluminación artificial en la nube utilizando visión artificial para la detección de la enfermedad del mildiu polvoriento de fresa. Computers and Electronics in Agriculture, 219-225.doi://doi.org/10.1016/j.compag.2019.02.007.

Morales, M. L. A., Andrade, H. P., Valencia, I. M. A., Romero, A. O. 2020. Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of Trichoderma harzianum. *Rev. mex. fitopatol*. vol.38, pp.434-449. ISSN 2007-8080. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7.

Morales, R. 2016. Berries, otra joya del campo mexicano. Periódico El Economista. En: http://eleconomista.com.mx/industrias/2020/02/10/berries-otra-joya-campo-mexicano Consultado el 26 de marzo de 2020.

Morales-Mora, L. A. 2022. Estudio de la relación de hongos asociados al cultivo de fresa y su respuesta a la inoculación del bio-gel fúngico a base de *Trichoderma sp*., in vitro. Tesis de Maestría.

Nava, P. E., Garcia, G. C., Camacho, B. J. R., Vázquez, M. E. L. 2012. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. Ra Ximhai. Vol. 8, Número 3. pp. 17-29.

Nygren, K., Strandberg, R., Wallberg, A., Nabholz, B., Gustafsson, T., García, D., Cano, J., Guarro, J., Johannesson, H. 2011.Una filogenia completa de Neurospora revela un vínculo entre el modo reproductivo y la evolución molecular en los hongos. 59 (3): 649-63. doi: 10.1016 / j. ympev.2011.03.023.

Pérez, L. V. M. 2016. Control biológico de plagas y enfermedades vegetales. Recuperado http://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/ofertas-tecnologicas.html.

Relevance of the Appropriate Control and Detection of Phytopathogens Fungi in Strawberries (*Fragaria* spp. 2015. Relevance of the Appropriate Control and Detection of Phytopathogens Fungi in Strawberries (*Fragaria* spp. Acta Química Mexicana.

Salamat, R., Ghassemzadeh, H. R., Heris, S. S. S., & Hajilou, J. (2013). Determination of appropriate harvesting time for strawberry to enhance its flavor index and reduce bruising susceptibility. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(8), 1969-1977.

Samuels, G. J., Lieckfeldt, E y Nirenberg, H. I. 1999. Trichoderma asperellum, a new species with warted conidia, and redescription of T. viride. Sydowia, 51(1):71-88. http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_51_0071- 0088.pdf

Serrano C, L., y Galindo F, E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario.

Serrano, L y Galindo, E. 2007. "Control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario", en Ciencia. 58(1): 77-88.

Serrano, L y Galindo, E. 2007. "Control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario", en Ciencia. 58(1): 77-88.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2019. Atlas Agroalimentario 1080-2019.

SIAP. 2018. “Atlas Agroalimentario 2017.”

SIAP. 2019. “Panorama Agroalimentario 2019.”

Solórzano, A. C., Martín, A., Salazar, S. M., Sandoval, J. S., Kirschbaum, D. S. 2015. Correlación entre la medida del color del fruto y la concentración de solidos solubles totales en frutilla o fresa (Fragaria ananassa Duch.). Rev. agron. noroeste argentino. (2015) 35 (1): 55-60 ISSN 0080-2069.

Torres, C. M., Ortiz, G. C., Bautista, M. C., Ramírez, P. J., Ávalos, C. N., Cappello, G. S y Cruz, P. A. 2015. Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. Revista Mexicana de Biodiversidad. 86(4):947-961.

Torres, E., Iannacone, J y Gómez, H. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Bragantia vol.67 no.1

Trapero-Casas. A. 2011. Los métodos de control de enfermedades: presente y futuro. Phytoma. Departamento de Agronomía, ETSIAM, Universidad de Córdoba.

Verma M, Brar S, Tyagi RD, Surampalli RY, Valero JR. 2007. Antagonistic fungi, Trichoderma spp.; Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37:1-20.