



*"Enseñar la explotación de la
tierra, no la del hombre"*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**

**IDENTIFICACIÓN Y CONTROL BIOLÓGICO DEL
COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA
SECADERA DE LA FRESA EN JACONA, MICHOACÁN,
2016**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN
VEGETAL**

PRESENTA:

MARÍA GABRIELA RAMÍREZ VALADEZ

Bajo la supervisión de: M.C. Ma. de Lourdes Rodríguez Mejía
Chapingo, Estado de México, octubre, 2017.



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



La presente Tesis titulada "**Identificación y control biológico del complejo de hongos causantes de la secadera de la fresa en Jacona, Michoacan, 2016**" realizada por **María Gabriela Ramírez Valadez** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: 

M.C. Ma. de Lourdes Rodríguez Mejía

ASESOR: 

Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR 

Dr. Juan Fernando Solís Aguilar

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico recibido durante mi formación profesional.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por la transmisión de conocimientos por parte de su personal docente.

A la MC María de Lourdes Rodríguez Mejía por su orientación, experiencia, muestras de dedicación, paciencia y esfuerzo durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su gran apoyo y amistad.

Al Profesor José Leónides García Rosas por compartir sus conocimientos y experiencia, por su paciencia y amistad.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos y Dr. Juan Fernando Solís Aguilar por su disponibilidad, orientación, aportaciones y observaciones realizadas a la presente investigación.

A la Dra. Guadalupe Carrillo por su apoyo y orientación en esta investigación.

A mis padres y mis hermanas por todo su amor, apoyo y confianza.

A Miguel por su amor, motivación, comprensión y confianza.

DATOS BIOGRAFICOS

El autor nació en la Ciudad de Irapuato, Guanajuato un 05 de diciembre de 1990. En el Municipio de Irapuato, Guanajuato realizó sus estudios básicos. Cursó el Bachillerato en el CBTa 174 de la Ciudad de Irapuato, titulándose como Técnico Agropecuario. Inició su formación profesional en la Universidad Autónoma Chapingo donde obtuvo el título de Agrónomo en Horticultura Protegida en septiembre del 2013. En agosto del 2015 inició sus estudios de Maestría en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, siendo miembro de la generación 57 como alumno del programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, finalizando en 2017 con la presentación de este trabajo de investigación.

IDENTIFICACIÓN Y CONTROL BIOLÓGICO DE LA SECADERA DE LA FRESA EN
JACONA, MICHOACÁN
IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL CONTROL OF THE CROWN AND ROOT ROT
OF STRAWBERRY IN JACONA, MICHOACÁN

Ramírez-Valadez M. G.¹, Rodríguez-Mejía M. L.²

RESUMEN

En México, la secadera de la fresa (*Fragaria x ananassa*) se ha asociado con un complejo fungoso demostrándose únicamente la implicación de *Fusarium oxysporum*. Por lo tanto el objetivo de esta investigación fue identificar el complejo de hongos causantes de la enfermedad en la región de Jacona, Michoacán y evaluar la capacidad antagonista de tres rizobacterias para su control. Se realizaron tres muestreos, en febrero, marzo y abril del 2016, de los cuales se obtuvieron siete hongos, tres pertenecientes al género *Fusarium* con el 54% de frecuencia de aislamiento, 38% al género *Neopestalotiopsis*, 5% a *Phytophthora* y 3% a *Rhizoctonia*. Estos hongos fueron sometidos a pruebas de patogenicidad en dos variedades de fresa: Albion y San Andreas, resultando más susceptible Albion y los hongos más virulentos fueron identificados molecularmente como *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. La identificación molecular se realizó a través de la extracción de DNA total de hongos. Las amplificaciones por PCR de la región ITS se realizaron mediante ITS4 e ITS5. De las pruebas *in vitro* el mejor tratamiento fue la rizobacteria N con un 68.8% de inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, y la rizobacteria chapingo con un 49.8% de inhibición de *Neopestalotiopsis*, mientras que bajo condiciones de invernadero el mejor tratamiento para el control de *F. oxysporum* fue la mezcla de chapingo + N con una eficacia de tratamiento del 51.4%, para *Neopestalotiopsis* spp. fue la rizobacteria N con un 57.8% de eficacia y para la mezcla de ambos hongos la mezcla de las tres rizobacterias fue el tratamiento el mejor tratamiento con una eficacia del 64.6%.

Palabras clave: secadera, *Fusarium oxysporum*, *Neopestalotiopsis*, antagonismo

¹Alumna de la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal

ABSTRACT

In Mexico, crown and root rot of strawberry (*Fragaria x ananassa*) has been associated with a fungal complex demonstrating only the involvement of *Fusarium oxysporum*. Therefore, the objective of this research was to identify the complex of fungi causing the disease in the region of Jacona, Michoacán and to evaluate the antagonistic capacity of three rhizobacteria for its control. Three samplings were performed in February, March and April of 2016, from which seven fungi were obtained, three belonging to the genus *Fusarium* with 54% isolation frequency, 38% to the genus *Neopestalotiopsis*, 5% to *Phytophthora* and 3% to *Rhizoctonia*. These fungi were tested for pathogenicity in two strawberry varieties: Albion and San Andreas, with the former proving more susceptible and the most virulent fungi were molecularly identified as *F. oxysporum* and *Neopestalotiopsis* spp. Molecular identification was performed through the extraction of total DNA from fungi. PCR amplifications of the ITS region were performed by ITS4 and ITS5. Of the *in vitro* tests the best treatment was the rhizobacteria N with 68.8% inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum*, and the rhizobacteria chapingo with 49.8% inhibition of *Neopestalotiopsis* spp., whereas under greenhouse conditions the best treatment for the control of *F. oxysporum* was the mixture of chapingo + N with a treatment efficiency of 51.4%; for *Neopestalotiopsis* spp. it was the rhizobacteria N with 57.8% efficacy and for the mixture of both fungi the mixture of the three rhizobacteria was the best treatment with an efficiency of 64.6%.

Keywords: crown and root rot, *Fusarium oxysporum*, *Neopestalotiopsis* spp., antagonism

²Director de Tesis

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. HIPÓTESIS.....	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 Importancia de la fresa a nivel nacional.....	4
4.2 Problemas fitosanitarios	4
4.2.1 Principales enfermedades de raíz y corona en el cultivo de fresa.....	5
4.2.1.1 Marchites por <i>Fusarium</i>	5
4.2.1.2 Pudrición de la corona	7
4.2.1.3 Marchitez por <i>Verticillium</i>	8
4.2.1.4 Pudrición por <i>Rhizoctonia solani</i>	9
4.3 Técnicas moleculares para la identificación de hongos y pseudohongos.....	10
4.4 Control biológico	11
4.4.1 Rizobacterias.....	13
4.4.2 Bacterias promotoras del crecimiento	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
5.1 Localización.....	22
5.2 Muestreo y obtención de material vegetal	22

5.3 Aislamiento y purificación de los hongos causales de la secadera de la fresa	22
5.4 Pruebas de patogenicidad	23
5.4.1 Material vegetal	23
5.4.1.1 Características de la variedad Albion	23
5.4.1.2 Características de la variedad San Andreas	24
5.4.2 Manejo del cultivo	24
5.4.3 Preparación de inóculo	24
5.4.4 Inoculación	25
5.4.5 Diseño experimental	26
5.4.6 Reaislamiento del agente causal	26
5.5 Identificación morfológica de los agentes causales de la secadera de la fresa.....	26
5.6 Identificación molecular de los agentes causales de la secadera de la fresa y análisis filogenético.....	27
5.7 Control biológico de la secadera de la fresa	28
5.7.1 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	29
5.7.1.1 Evaluación del antagonismo de bacterias sobre los hongos causantes de la secadera de la fresa.....	29
5.7.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico	30
5.8 Fase de invernadero.....	30
5.8.1 Establecimiento del experimento en invernadero.....	30
5.8.2 Preparación del inóculo	30

5.8.3 Preparación de bacterias antagónicas	30
5.8.4 Trasplante	31
5.8.5 Tratamientos	31
5.8.6 Variables a evaluar	32
5.8.6.1 Incidencia de la enfermedad	32
5.8.6.2 Severidad de la enfermedad	32
5.8.7 Diseño experimental y análisis estadístico	32
5.8.8 Eficacia de los tratamientos.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1 Frecuencia de aislamiento de hongos asociados a la secadera de la fresa.....	34
6.1.1 Descripción morfológica de los hongos aislados en medio de cultivo PDA.....	36
6.1.1.1 Hongo H1.....	36
6.1.1.2 Hongo H2.....	37
6.1.1.3 Hongo H3.....	38
6.1.1.4 Hongo H4.....	38
6.1.1.5 Hongo H5.....	39
6.1.1.6 Hongo H6.....	40
6.1.1.7 Hongo H7	40
6.2 Pruebas de patogenicidad	40
6.2.1 Incidencia	40

6.2.2 Severidad	43
6.3 Identificación molecular de los agentes causales de la secadera de la fresa	47
6.4 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	49
6.4.1 <i>Fusarium</i>	49
6.4.2 <i>Neopestalotiopsis</i>	50
6.5 Pruebas de antagonismo <i>in vivo</i>	52
6.5.1 Incidencia	52
6.5.1.1 <i>Fusarium</i>	52
6.5.1.2 <i>Neopestalotiopsis</i>	54
6.5.1.3 <i>Fusarium</i> + <i>Neopestalotiopsis</i>	56
6.5.2 Severidad	58
6.5.2.1 <i>Fusarium</i>	58
6.5.2.2 <i>Neopestalotiopsis</i>	60
6.5.2.3 <i>Fusarium</i> + <i>Neopestalotiopsis</i>	62
6.6 Eficacia de los tratamientos	64
7. DISCUSIÓN	66
8. CONCLUSIONES	72
9. BIBLIOGRAFIA	73

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mezclas de los hongos más frecuentemente aislados de la secadera de la fresa para probar su patogenicidad en plantas de fresa de las variedades Albión y San Andreas, en Chapingo, Edo de México, 2016.....	25
Cuadro 2. Componentes y cantidades en la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS).....	27
Cuadro 3. Tratamientos evaluados <i>in vitro</i> para evaluar el antagonismo de bacterias de la colección de organismos antagónicos del área de Fitobacteriología del Dpto. de Parasitología Agrícola 2016	29
Cuadro 4. Tratamientos evaluados <i>in vivo</i> para evaluar el antagonismo de bacterias de la colección de organismos antagónicos del área de Fitobacteriología del Dpto. de Parasitología Agrícola 2016.	31
Cuadro 5. Frecuencia de aislamiento de hongos asociados a la secadera en diferentes muestreos en Jacona, Michoacán, 2016.....	35
Cuadro 6. Medias de porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad Albión en diferentes fechas en Jacona, Michoacán, 2016	45
Cuadro 7. Medias de porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad San Andreas en diferentes fechas en Jacona, Michoacán, 2016.....	46

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>F. oxysporum</i> agente causal de la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, con rizobacterias antagonistas	49
Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. agente causal de la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, con rizobacterias antagonistas	51
Cuadro 10. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por <i>F. oxysporum</i> en Jacona, Michoacán, 2016.....	54
Cuadro 11. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en Jacona, Michoacán, 2016.	55
Cuadro 12. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por los patógenos <i>F. oxysporum</i> y <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en Jacona, Michoacán, 2016	58
Cuadro 13. Comparación de medias del porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por el patógeno <i>F. oxysporum</i> en Jacona, Michoacán, 2016.	60

Cuadro 14. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albi3n causadas por el pat3geno <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en Jacona, Michoac3n, 2016	62
Cuadro 15. Comparaci3n de medias del porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad Albi3n causadas por los pat3genos <i>F. oxysporum</i> y <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en Jacona, Michoac3n, 2016.	64
Cuadro 16. Porcentaje de eficacia de las rizobacterias aplicadas en plantas de fresa variedad Albi3n infectadas por los pat3genos <i>F. oxysporum</i> y <i>Neopestalotiopsis</i> spp. agentes causales de la secadera en Jacona, Michoac3n, 2016.....	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de fresa con síntomas de secadera, en Jacona, Michoacán, 2016.....	34
Figura 2. Frecuencia de aislamiento de hongos asociados a la secadera de la fresa en Jacona Michoacán 2016.	36
Figura 3. A) Crecimiento de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de conidios de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	37
Figura 4. A) Crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de macroconidios de <i>Fusarium</i> spp.....	37
Figura 5. A) Crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de microconidios de <i>Fusarium</i> spp.....	38
Figura 6. A) Crecimiento de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de microconidios de <i>Fusarium</i> spp.....	39
Figura 7. A) Crecimiento de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de conidios de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	39
Figura 8. Microfotografía (40X) de micelio de <i>Rhizoctonia</i> spp.	40
Figura 9. A) Planta de fresa variedad Albión con amarillamiento. B) Planta de fresa variedad Albión con necrosis en los bordes de las hojas. C) Planta de fresa variedad Albion sana.....	41

Figura 10. Porcentaje de incidencia de los hongos que ocasionan la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, a los 20, 40 y 60 ddt sobre plantas de fresa variedad Albión.	42
Figura 11. Porcentaje de incidencia de los hongos que ocasionan la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, a los 20, 40 y 60 ddt sobre plantas de fresa variedad San Andreas.	43
Figura 12. Árbol filogenético del aislamiento H4 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, basado en el modelo Kimura 2- parámetros.....	47
Figura 13. Árbol filogenético del aislamiento H1 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, basado en el modelo Kimura 2- parámetros.....	48
Figura 14. Efecto antagónico de las rizobacterias contra <i>F. oxysporum</i> en medio de cultivo B de King a los siete días. (A) Tratamiento testigo del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> . (B) Inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> por la cepa chapingo. (C) Inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> por la cepa N. (D) Inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> por la cepa Col BII.....	50
Figura 15. Efecto antagónico de las rizobacterias contra <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en medio de cultivo B de King a los siete días. (A) Tratamiento testigo del crecimiento de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. (B) Inhibición del crecimiento de	

<i>Neopestalotiopsis</i> spp. por la cepa chapingo. (C) Inhibición del crecimiento de	
<i>Neopestalotiopsis</i> spp. por la cepa N. (D) Inhibición del crecimiento de	
<i>Neopestalotiopsis</i> spp.por la cepa Col BII.	52

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) ha sido importante para México desde mediados del siglo XX, cuando se inició la demanda del producto en el mercado estadounidense (Bucio *et al.*, 2016)

La fresa se cultiva en más de 20 países, siendo China el principal productor con 3, 113,000 t, seguido de Estados Unidos, y México con el tercer lugar con una producción correspondiente a 458,972 t en el 2015 (FAOSTAT, 2017).

Este cultivo genera en el país el 1.1% del valor generado por el sector agrícola, cerca de 4,200 mdp, además de ser un importante producto de exportación. Los principales países a los cuales se exporta la fresa son Estados Unidos, China y la Unión Europea (SAGARPA, 2015).

Se estima que a lo largo de la cadena de producción y la cadena agroindustrial de la fresa se generan 15,000 empleos directos y 4,500 indirectos. El volumen y valor de producción de fresa se concentra en un 96% en los estados de Michoacán, Baja California, Jalisco y Guanajuato (SIAP, 2015)

En México, las enfermedades de la raíz causadas por hongos y pseudohongos son las principales limitantes fitosanitarias del cultivo de la fresa, destacando la secadera, la cual consiste en un marchitamiento y muerte gradual de la planta (Castro y Dávalos, 1990) se considera como la enfermedad más destructiva de este cultivo, debido a su incidencia, distribución y difícil control (Ceja *et al.*, 2008). La enfermedad puede ser ocasionada por un complejo de hongos de los géneros;

Fusarium, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* y *Colletotrichum* que pueden causar pérdidas del cultivo mayores al 50%, cuando se presentan condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad y no se controla a tiempo (Ceja *et al.*, 2001).

Las aplicaciones de productos químicos han sido efectivas para controlar la secadera de fresa, desafortunadamente el uso indiscriminado de fungicidas y el desconocimiento de diversas estrategias de uso de estos productos, han dado origen al problema de resistencia. Además la exigencia del mercado de exportación de los países de E.E. U.U. y China de consumir productos libres de plaguicidas, reduce la cantidad de productos químicos que se pueden usar para el control de esta enfermedad, por lo anterior surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de manejo que sean eficientes como el uso de bacterias antagonicas y extractos orgánicos, sin que estos afecten el rendimiento y calidad de la fresa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el complejo de hongos causantes de la secadera de la fresa y evaluar el potencial antagonista *in vitro* e *in vivo* de rizobacterias para el control de la enfermedad.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar el hongo o complejo de hongos causantes de la secadera de la fresa
2. Evaluar el efecto antagonista *in vitro* de tres rizobacterias sobre los hongos que causan la secadera de la fresa.
3. Determinar el efecto antagonista *in vivo* de tres rizobacterias y sus mezclas sobre los hongos que causan la secadera de la fresa.

3. HIPÓTESIS

1. Al menos uno de los hongos encontrados ocasiona la enfermedad
2. Al menos una rizobacteria tendrá efecto antagonista *in vitro* a los hongos que ocasionan la secadera de la fresa.
3. Al menos una rizobacteria o una mezcla de estas, tendrá efecto antagonista *in vivo* a los hongos que ocasionan la secadera de la fresa.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia de la fresa a nivel nacional

En México se cultivan más de 5 mil hectáreas de fresa, distribuidas en los estados de: Baja California, Guanajuato, Jalisco y Michoacán. El volumen y valor de la producción de fresa se concentra en un 96% en estos cuatro estados. Michoacán cultiva cerca del 60 % de la superficie nacional con aproximadamente 3 mil ha cultivadas. Específicamente, en el Valle de Zamora, se establecen aproximadamente 2 mil ha (SAGARPA, 2015).

4.2 Problemas fitosanitarios

Las plantas de fresa se ven afectadas por un gran número de plagas causadas por hongos, bacterias, virus, nematodos y artrópodos. Estos patógenos causan daño en las hojas, raíces, coronas y frutos. La susceptibilidad de la planta huésped, el patógeno y las condiciones ambientales favorables (temperatura, humedad) son los tres principales factores necesarios para el inicio y desarrollo de la enfermedad de las plantas (Maas, 2004).

El cultivo de fresa es susceptible al ataque de 67 especies diferentes de hongos fitopatógenos, los cuales pertenecen al Phylum Ascomycota, Omycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. Varios de estos hongos invaden las raíces primarias y atacan y/o destruyen las raíces secundarias, limitando la capacidad de la planta de tomar agua y nutrientes (Garrido *et al.*, 2016).

4.2.1 Principales enfermedades de raíz y corona en el cultivo de fresa

En México, las enfermedades de la raíz causadas por hongos y pseudohongos son las principales limitantes fitosanitarias del cultivo de la fresa destacando la secadera la cual consiste en un marchitamiento y muerte gradual de la planta.

La secadera de la fresa se considera como la enfermedad más destructiva de este cultivo, debido a su incidencia, distribución y difícil control. La enfermedad se ha asociado con diversos organismos sobresaliendo, cuatro especies de *Fusarium*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora* spp. (Ceja-Torres *et al.*, 2008). Los cuales pueden causar pérdidas del cultivo mayores al 50%, cuando se presentan condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad y no se controla a tiempo (Ceja *et al.*, 2001).

4.2.1.1 Marchites por *Fusarium*

Esta enfermedad es causada en México por los hongos *Fusarium oxysporum* Schlecht y *Fusarium solani* Snyder y Hansen capaces de causar daños significativos a las plantas de fresa. *F. oxysporum* es el principal agente causal de la enfermedad marchitamiento por *Fusarium* (Ceja-Torres *et al.*, 2008), y es la principal causa de pérdidas económicas en el cultivo de fresas (Garrido *et al.*, 2016).

Este hongo cosmopolita del suelo se considera un habitante natural de la rizosfera de las plantas (Fravel *et al.*, 2003). Las clamidosporas del patógeno

pueden sobrevivir en la materia orgánica del suelo o en la rizósfera de muchas especies vegetales durante largos periodos de tiempo (Fravel *et al.*, 2003) los cuales pueden servir como inóculo primario para otras plantas hospederas (Garrido *et al.*, 2016).

El hongo penetra las plantas de fresa a través de las raíces, coloniza la corteza de la raíz y luego crece dentro del xilema, interrumpiendo el transporte de agua a través de la planta. Esto lleva a los síntomas típicos de la decoloración del tejido interno de la corona, tejidos vasculares, corticales y los tejidos internos de las principales raíces (Koike *et al.*, 2009). Los síntomas en la parte aérea se observan como el marchitamiento de las hojas más viejas, estas se vuelven de color gris verde, y comienzan a secarse, mientras que en plantas recién trasplantadas dejan de crecer y parecen estar atrofiadas. A medida que la enfermedad progresa, todo el follaje se seca con la excepción de las hojas centrales más jóvenes (Koike *et al.*, 2009).

El clima cálido y el estrés de la planta por riego insuficiente o excesivo, así como otros factores, hacen que la enfermedad se desarrolle más rápido. Las plantas pueden llegar a colapsar y morir por completo. En las partes infectadas de la planta se pueden producir masas viscosas, blancas o rosadas de conidios. Las clamidosporas se producen en tejido vegetal infectado y se liberan en el suelo (Maas, 2004).

Tradicionalmente, el manejo de la marchitez por *Fusarium* en el cultivo de fresa ha sido principalmente a través de la fumigación química del suelo, sin embargo, la estrategia más rentable y ambientalmente sostenible es el uso de cultivares resistentes. La resistencia genética ha proporcionado un control efectivo de la marchitez por *Fusarium* en muchos cultivos, aunque la durabilidad de la resistencia ha sido variable con la aparición de nuevas razas resistentes a patógenos (Garrido *et al.*, 2016).

4.2.1.2 Pudrición de la corona

El género *Phytophthora* comprende organismos semejantes a hongos; Incluye más de 80 especies, de las cuales, al menos ocho especies han sido aisladas de raíces, coronas, estolones y frutos de fresas afectadas en diferentes regiones del mundo (Abad *et al.*, 2008). Las especies *P. cactorum* y *P. fragariae* var. *fragariae* son los patógenos más importantes y se encuentran en casi todos los países donde se cultiva fresa (Garrido *et al.*, 2016).

P. cactorum, provoca la pudrición de la fruta, tallo, corona y raíz de la fresa (Abad *et al.*, 2008). Generalmente la infección ocurre durante períodos con alta temperatura y humedad prolongada (Garrido *et al.*, 2016). Los síntomas se muestran como marchitamiento repentino de hojas jóvenes que se tornan de color azul verdoso y las hojas más viejas se vuelven amarillentas. Las plantas muy enfermas pueden colapsar rápidamente o permanecer atrofiadas, produciendo pocos estolones y frutas pequeñas (Maas, 1998).

En la corona los síntomas aparecen en la parte superior y se propagan de forma basipetala, o puede partir del tocón que deja el estolón. Los tejidos recién invadidos aparecen con manchas aguanosas y de color marrón claro. Las coronas severamente atacadas se tornan de color marrón intenso, y el centro de las raíces muestra una decoloración marrón rojiza (Koike *et al.*, 2005). Coronas que han sido dañadas por lesiones a baja temperatura durante el almacenamiento en frío están predispuestas a la infección (Maas, 2004).

Las oosporas son las estructuras fundamentales de persistencia de esta especie pudiendo perdurar libres en el suelo por más de un año. Las oosporas en el suelo o en los desechos de las plantas de fresa proporcionan las fuentes de inóculo primario (Iribarren *et al.*, 2012). Estas germinan para producir zoosporangios y zoosporas que infectan las plantas, usualmente en heridas. El hongo requiere temperaturas cálidas y periodos prolongados de humedad para la infección y la producción de inóculo (Maas, 2004).

4.2.1.3 Marchitez por *Verticillium*

Verticillium es un género de hongos pertenecientes al filo Ascomycota, y causa el marchitamiento de más de 300 especies de plantas. Dos especies de *Verticillium*, *V. dahliae* y *V. albo-atrum* causan enormes pérdidas económicas en el cultivo de fresa ya que causan enfermedades vasculares en las plantas (Maas, 1998). *Verticillium* pasa el invierno como micelio latente o microesclerosios en el suelo y residuos vegetales. Una vez dentro de la raíz, el hongo invade y destruye

el xilema, resultando en una menor absorción de agua por la planta, haciendo que las plantas se marchiten (Garrido *et al.*, 2016).

Una vez en el xilema, el patógeno produce esporas que pueden moverse hacia arriba al ser transportadas por el agua proveniente de la raíz y continua hacia los brotes (Gordon y Subbarao, 2007). Cuando se establece la infección, las hojas se vuelven rojizas o de color amarillo oscuro en los bordes y entre las venas se marchitan se secan y caen. En los estolones y en los pecíolos de las hojas pueden aparecer rayas o manchas negras. Las nuevas raíces que crecen de la corona se ensombrecen con las extremidades ennegrecidas y el interior de la corona puede tener rayas marrones (Garrido *et al.*, 2016). Los síntomas aparecen rápidamente, cuando se registra un incremento en la temperatura, intensidad de luz o sequía. La marchitez por *Verticillium* tiende a ser más severa en plantas en etapa de fructificación (Garrido *et al.*, 2016).

4.2.1.4 Pudrición por *Rhizoctonia solani*

Los patógenos que atacan el sistema radical son importantes ya que el daño lo causan en la zona no visible de la planta y cuando los síntomas se manifiestan en la parte aérea de la planta la mayoría de las veces el rendimiento de la planta ya está comprometido y la supervivencia de la planta está en peligro. La pudrición negra de la fresa ocasionada por *Rhizoctonia solani* está ampliamente distribuida en todas las regiones del mundo productoras de fresa (Asad-Uz-Zaman *et al.*, 2015). Este patógeno ataca principalmente en la etapa de desarrollo vegetativo de la planta (Bodah, 2017).

El patógeno puede ser introducido a la zona de producción por el trasplante de plantas enfermas. El agente causal de esta enfermedad, puede causar la pudrición de la corona, la pudrición de las raíces y la muerte de las plantas. La enfermedad se ve favorecida en suelos con mal drenaje (Wing *et al.*, 1995).

Los síntomas en la parte aérea se manifiestan como hojas que tienden a curvarse hacia arriba y en la parte inferior se tornan violáceas. Los pecioloos se vuelven marrones. La corona principal al ser severamente dañada puede producir numerosas coronas laterales, las cuales muestran una decoloración marrón en los tejidos basales, mientras que las raíces adventicias suelen estar muertas y de color negro (Maas, 1998).

4.3 Técnicas moleculares para la identificación de hongos y pseudohongos

La identificación correcta de organismos patógenos de las plantas cultivadas es importante en la implementación de estrategias para el manejo y control de enfermedades. Particularmente se requiere la caracterización fenotípica y genética de los fitopatógenos persistentes en un área determinada. La aplicación de técnicas moleculares, permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de hongos fitopatógenos, principalmente cuando los criterios morfológicos de clasificación son variables (Garrido *et al.*, 2016). El uso de técnicas moleculares permite la identificación de organismos fitopatógenos de forma certera por estar basado en la composición del DNA.

Entre las técnicas disponibles para la identificación de patógenos, las basadas en los ácidos nucleicos son ampliamente reconocidas por ser las más exactas. Estos métodos incluyen la comparación de isoenzimas, fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) de ADN mitocondrial, análisis ricos en AT, análisis de amplificación aleatoria de ADN poliformico (RAPD), para género y especie específico se utilizan los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Garrido *et al.*, 2012).

White *et al.* (1990) describieron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del operón rDNA ribosomal, en la molécula de DNA de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estas regiones.

4.4 Control biológico

Tradicionalmente, el control de hongos y bacterias que atacan cultivos está basado en el uso de compuestos químicos como fungicidas y bactericidas (Carbú *et al.*, 2016). En todo el mundo, la práctica más frecuente para el manejo de las enfermedades de la fresa es la aplicación de productos químicos, junto con otras prácticas de manejo, como la reducción de la densidad de población, la eliminación de las plantas enfermas y desechos vegetales así como el monitoreo constante en las plantas, etc. (Maas, 2004). En las últimas décadas la fumigación química del suelo ha sido de suma importancia para la producción del cultivo de fresa y para la producción de plántula. Sin embargo, el aumento del uso de

agentes de control biológico para el control de patógenos de frutas y hortalizas es cada vez más común (Carbú *et al.*, 2016).

El uso de métodos biológicos para el control de fitopatógenos ha sido estudiado por más de 70 años y parece ser una opción factible. Sin embargo todavía hay un largo camino por recorrer para desarrollar un sistema eficaz de producción de fresa basado en el uso de métodos de control biológico con resultados similares a los obtenidos con la fumigación química del suelo. Para lograr un control exitoso con estos métodos, es necesario tener un amplio conocimiento sobre los patógenos que controlan, cómo estos destruyen las plantaciones, su distribución en las áreas de producción, la época del año en que tienen mayor impacto, cómo los favorecen las condiciones ambientales, la influencia de las prácticas de cultivo sobre estos y cómo los agentes de control biológico pueden ejercer sus efectos protectores en las plantas (Martin y Bull 2002).

El control biológico de enfermedades de plantas fue definido por Eilenberg *et al.* (2001) como el uso de organismos vivos para el control de organismos fitopatógenos. Los principales usos de los agentes de control biológico son: control biológico de plagas de invertebrados utilizando depredadores, parasitoides y patógenos, control biológico de malezas usando herbívoros y patógenos, y control biológico de patógenos de plantas usando microorganismos antagonistas e inducción de la resistencia de las plantas (Eilenberg *et al.*, 2001).

El control biológico de hongos fitopatógenos con microorganismos se ha desarrollado como una alternativa al tratamiento con fungicidas y se ha logrado un éxito considerable en el control de las enfermedades antes y después de la cosecha. Los microorganismos antagonistas deben interactuar con las plantas, patógenos potenciales, variables ambientales y organismos nativos bajo condiciones microclimáticas imperantes (Sutton, 1994). También deben ser colonizadores naturales de frutos, hojas y raíces de fresa, y ser capaces de interactuar exitosamente con la planta, condiciones microbiológicas y otras condiciones ambientales (Maas, 2004). Varios mecanismos utilizados por los agentes de control biológico para el control de hongos fitopatógenos incluyen, antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, inducción de respuestas de defensa de las plantas, supresión de esporulación y micoparasitismo (Carbú *et al.*, 2016).

En el cultivo de fresa, se han estudiado dos grupos de microorganismos como agentes de control biológico contra hongos fitopatógenos: i) rizobacterias, siendo los principales miembros de este grupo; *Pseudomonas* y *Streptomyces* spp. y ii) miembros del género *Trichoderma* el cual es un hongo antagonista, considerado como el agente de control biológico más efectivo identificado hasta la fecha (Garrido *et al.*, 2011).

4.4.1 Rizobacterias

La rizosfera es el sitio de interacción entre plantas, microorganismos patógenos y rizobacterias/hongos antagonistas. Con frecuencia las rizobacterias

antagonistas son investigadas en sistemas de agricultura sustentable debido a su capacidad de suprimir patógenos presentes en el suelo. Dentro de los mecanismos propuestos para explicar este efecto destaca el control biológico de fitopatógenos, el cual se explica fundamentalmente mediante características básicas que manifiestan las rizobacterias y que incluyen su capacidad de producir sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles y enzimas líticas, entre otros metabolitos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006).

El desarrollo de nuevas técnicas biológicas y moleculares han permitido entender más a fondo los mecanismos moleculares y los genes involucrados en la capacidad antagonista de las rizobacterias (Garrido *et al.*, 2011). Costa *et al.* (2007) emplearon un conjunto de herramientas para probar si las poblaciones de las bacterias antagonistas de *Pseudomonas* spp. eran dominantes en la rizosfera de plantas hospederas de *V. dahliae*. Ellos desarrollaron un nuevo sistema de reacción en cadena de la polimerasa/electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) para caracterizar los genes tipo *gacA* dentro del género *Pseudomonas* spp. Se sabe que el gen *gacA* es necesario para la producción de muchos metabolitos secundarios y exoenzimas en *Pseudomonas* spp. (Heeb y Haas, 2001) y estos promueven la síntesis de moléculas implicadas en las interacciones antagónicas y supresión de enfermedades, tales como antibióticos y biocidas.

Pseudomonas fluorescens cepa EPS817 y EPS894 protegen a las plantas de fresa de *P. cactorum* mediante la producción de diferentes metabolitos, estas cepas fueron combinadas para mejorar el nivel de biocontrol que ejercen por si solas. EPS817 produce 2,4-diacetylphloroglucinol y HCN, y EPS894 produce ácido phenazine-1-carboxylic y Pirólato. La interacción entre cepas bacterianas y *P. cactorum* revelaron una inhibición significativa de la germinación de quistes *in vitro*. Por microscopía electrónica de barrido se confirmó que cada cepa inhibía la germinación de quistes de *P. cactorum* en la superficie de la raíz de la fresa. Las cepas bacterianas fueron capaces de colonizar y sobrevivir sobre las raíces de fresa individualmente y juntas, lo que indica la compatibilidad entre las cepas. Los experimentos de biocontrol realizados en maceta bajo condiciones de invernadero revelaron que la mezcla de ambas cepas redujo la severidad de la enfermedad de la pudrición de la raíz ocasionada por *Phytophthora* (Agustí *et al.*, 2011).

Anandhakumar y Zeller (2008) realizaron una identificación *in vitro* de más de 100 rizobacterias para el control de *Phytophthora*. Ellos encontraron que tres géneros de bacterias, *Raoultella terrigena*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens*, tienen efectos inhibitorios en el crecimiento micelial de *P. fragariae* var. *fragariae* y *P. cactorum*. De estas tres especies *Raoultella terrigena* tiene la mayor actividad inhibitoria.

Un parámetro que juega un papel importante en la eficacia del agente aplicado sobre el patógeno objetivo es el método de su aplicación o tratamiento de los agentes biológicos. Estos pueden ser aplicados antes de la siembra, en el trasplante, o directamente en las raíces de las plantas por drench. En el estudio de Anandhakumar y Zeller (2008), las raíces de las plantas de fresa fueron sumergidas en una suspensión de células bacterianas antes del trasplante. Las ventajas de este método fueron i) las raíces están directamente expuestas al inóculo bacteriano libre de otros patógenos y ii) el pre tratamiento asegura mayores niveles de actividad, reduce los costos de producción, simplifica la formulación y aplicación, reduce los costos de aplicación y minimiza el impacto ambiental. Bajo condiciones naturales en un cultivo de varios ciclos, *Raoultella terrigena* y *Bacillus amyloliquefaciens* mostraron un efecto significativo de control en la primera temporada de producción (37.5%), mientras que en la segunda temporada *Raoultella terrigena* mostro más efectividad (45.1%).

En un estudio llevado a cabo en dos especies de fresa *ananassa* y *viridis* Berg et al. (2000) aislaron de la rizosfera de ambas especies, las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces diastachromogenes*, mientras que *Pseudomonas chlororaphis* se encontró solo en la rizosfera de *ananassa* y *Streptomyces exfoliatus* solo en la rizosfera de *viridis*. En ensayos *in vitro*, los autores concluyeron que todos los aislamientos inhibieron el crecimiento de *V. dahliae*. En experimentos en macetas en invernadero y campo, los tratamientos con bacterias también resultaron eficientes

en la inhibición del patógeno, además de incrementar la producción de fresa. También se encontró que el tratamiento con *Pseudomonas* incremento el rendimiento de los frutos hasta en un 344% (Berg *et al.*, 2000). La explicación a este efecto reside en las interacciones que tienen lugar entre el hospedero y los microorganismos; esta asociación provee a la planta con nutrientes y condiciones ambientales que favorecen el desarrollo del sistema radicular.

Nam *et al.* (2009) aislaron dos cepas de *Bacillus velezensis* cepa BS87 y RK1 las cuales mostraron altos niveles de antagonismo contra *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* bajo condiciones *in vitro*. Estas mismas cepas fueron evaluadas en invernadero y en campo. En invernadero encontraron que la concentración óptima para BS87 fue de 1×10^5 unidades formadoras de colonia (UFC)/mL, mientras que para la cepa RK1 la concentración optima fue de 1×10^6 UFC/mL aplicando las bacterias antes del trasplante por inmersión de las raíces. En campo ambas cepas mostraron control de la enfermedad, sin embargo la cepa RK1 resulto más efectiva que la cepa BS87.

Shen *et al.* (2016) utilizaron salvado de trigo y vermicomposta para la fermentación de *Streptomyces hygroscopicus* cepa B04 para la producción de fertilizantes bioorgánicos. Realizaron experimentos en macetas y en campo para evaluar los efectos del fertilizante bioorganico B04 (BOF-B04) en suelos infestados con *F. oxysporum*. BOF-B04 incremento el peso fresco de las plantas y disminuyo la incidencia de la pudrición de raíces. Las eficiencias de biocontrol

de BOF-B04 fueron de 63.35% en macetas y 56.77% en campo. Esto debido a la capacidad de *Streptomyces hygroscopicus* cepa B04 de producir enzimas que degradan la pared celular de los hongos como quitinasa, β -1,3, glucanasa, celulosa y proteasa.

En un ensayo realizado por Pastrana *et al.* (2016) utilizaron un producto comercial (Fusbact®) a base de *Bacillus megaterium* y *Bacillus laterosporus* para evaluar su potencial antagonista *in vitro*, en invernadero y en condiciones de campo. *In vitro* obtuvieron un 36% de inhibición del crecimiento radial de *F. solani*. Al aplicar el producto por inmersión de raíces antes de la inoculación de *F. solani* obtuvieron el 100% de control en condiciones de invernadero y el 81% bajo condiciones de campo.

Para poder desarrollar un producto comercial para fresa basado en el uso de enzimas quitinolíticas producidas por *Serratia plymuthica*, Kurze *et al.* (2001) evaluaron el potencial de una cepa aislada de la rizósfera de canola para controlar la marchitez por *Verticillium* y la pudrición de la raíz de la fresa por *Phytophthora*. Inoculaciones artificiales con *Serratia plymuthica* controlaron la marchitez y la pudrición de la raíz de las plantas de fresa incluso incrementan la producción en el número de brotes, flores y frutos. Basados en estos resultados, ellos patentaron a *Serratia plymuthica* (cepa HRO-C48) como un agente de control biológico (Berg *et al.*, 2002).

4.4.2 Bacterias promotoras del crecimiento

Otra alternativa para la protección de cultivos contra patógenos es el control biológico ejercido por algunas bacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPB). Estas PGPB son benéficas para el crecimiento de las plantas, rendimiento y calidad e los cultivos. Este grupo de bacterias incluye miembros de los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* y *Serratia* (Bashan y de Bashan, 2005).

Los mecanismos por los cuales las PGPB promueven el crecimiento de las plantas aún no está muy claro pero se cree que incluyen i) la habilidad de producir fitohormonas, como auxinas, citocininas y giberelina, y la inhibición de la producción de etileno; ii) fijación asintomática de nitrógeno; iii) solubilización de fosforo inorgánico y mineralización de fosforo orgánico y de otros nutrientes y iv) antagonismo contra microorganismos fitopatógenos por la producción de sideróforos, la síntesis de antibióticos, enzimas y/o compuestos fungicidas, y la competencia con microorganismos fitopatógenos (Carbú *et al.*, 2016).

Azospirillum es una PGPB muy estudiada capaz de colonizar naturalmente muchas especies de plantas, incluyendo la fresa. Diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* aisladas de plantas de fresa muestran características importantes dentro del grupo de las PGPB: i) actividad fijadora de nitrógeno; ii) producción de sideróforos e índoles; iii) el promover el crecimiento de las plantas

de fresa (Pedraza *et al.*, 2010). Tortora *et al.* (2012) caracterizaron la resistencia sistémica inducida por *Azospirillum brasilense* en plantas de fresa a nivel bioquímico y molecular. Sus resultados revelaron la acumulación de ácido salicílico y la inducción de genes relacionados con la defensa, lo que sugiere que esta respuesta está relacionada con las modificaciones estructurales de la pared celular como consecuencia del aumento de los compuestos fenólicos y la deposición callosa. Concluyeron que *Azospirillum brasilense* protegió las plantas de fresa contra la enfermedad por antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum*.

En un trabajo posterior, Guerrero-Molina *et al.* (2012) demostraron la existencia de una asociación eficaz de *Azospirillum brasilense* en la raíz y la posterior colonización a través de estolones de una planta madre de fresa inoculada con bacterias a las plántulas. A medida que las plantas de fresa se reproducen comercialmente en viveros mediante la siembra de estolones en el suelo, estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar una sola inoculación con la PGPB seleccionada para producir grandes cantidades de plantas en vivero ya inoculadas y listas para plantar en el campo.

Otras características que han sido estudiadas son el efecto promotor del crecimiento de aspersiones foliares y la inoculación de raíces con *Bacillus* y *Pseudomonas* en el rendimiento de fresa (Esitken *et al.*, 2010). Los resultados de del estudio realizado por Esitken *et al.* (2010) mostraron que la inoculación de

raíces con *Bacillus* (cepa M3) y la aspersión con *Pseudomonas* (cepa BA-8) o *Bacillus* (cepa OSU-142) afectaron significativamente el rendimiento de frutos, contenido de vitamina C y número de frutos por planta, incrementando el crecimiento y contenido de fósforo, hierro, cobre y zinc en las plantas de fresa y el incremento de la disponibilidad de fósforo, hierro zinc, potasio y magnesio en el suelo. Los autores concluyen que las bacterias usadas en este estudio son un biofertilizante prometedor para la producción sustentable de frutos y vegetales bajo sistemas de agricultura orgánica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero de bacterias pertenecientes al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.2 Muestreo y obtención de material vegetal

Los muestreos se realizaron en el rancho Agro del Valle de Zamora, ubicado en el municipio de Jacona, Michoacán, con coordenadas 19° 98' 39" de latitud norte y 120° 30' 02" longitud oeste, con una altitud de 1580 msnm, con una precipitación pluvial anual de 800 mm y temperatura media anual de 27°C.

El material vegetal se obtuvo de plantas de fresa con síntomas de secadera de la variedad OCEOLA®, mediante muestreos completamente al azar realizados el 13 de febrero, 4 de marzo y 9 de abril del 2016. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno y se etiquetaron para su identificación y traslado al laboratorio de bacterias para ser procesadas

5.3 Aislamiento y purificación de los hongos causales de la secadera de la fresa

La corona y raíz de las plantas se lavaron con agua corriente y se cortaron en pedazos de 1 cm² y de 1 cm de longitud. En condiciones asépticas se desinfectó el material con hipoclorito de sodio al 2% por un minuto y enjuagando tres veces

con agua destilada y estéril, después se colocaron cinco trozos en cada caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y medio de Agar V8 (V8), una vez que se observó crecimiento micelial, este se transfirió al medio de cultivo Agua Agar para obtener puntas de hifa, las cuales se transfirieron a medio PDA. Una vez que se obtuvieron las colonias puras se contabilizo la frecuencia de aislamiento de los hongos.

5.4 Pruebas de patogenicidad

Una vez aislados los organismos causantes de la secadera de la fresa, se seleccionaron aquellos organismos con mayor frecuencia, los cuales se utilizaron para determinar su capacidad para reproducir los síntomas de la secadera.

5.4.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de la variedad Albión y San Andreas, las cuales se trasplantaron en bolsas de 15 L con suelo estéril.

5.4.1.1 Características de la variedad Albion

La variedad Albion se originó en la Universidad de California al cruzar la variedad Diamante y la variedad Cal 94.16-1. Es una variedad de día neutro, son plantas vigorosas, con alta productividad por largos periodos de tiempo, produce frutos grandes, cónicos, firmes, uniformes, de excelente sabor, y de color rojo brillante y con larga vida de anaquel. Esta variedad es moderadamente resistente a *Ramularia tulasnei*, *Sphaerotheca macualris*, *Colletotrichum acutatum*, es

altamente resistente a *Verticillium dahliae* y *Phytophthora cactorum* y tolerante a *Tetranychus urticae* (Shaw y Larson 2006).

5.4.1.2 Características de la variedad San Andreas

Se originó a partir de la cruce de las variedades Albion y Cal 97.86-1. Es una variedad de día neutro, son plantas compactas y vigorosas, con mejores rendimientos y excelente calidad de fruta, con mejor apariencia y sabor que la variedad Albion. Esta variedad es moderadamente resistente a *Sphaerotheca macularis*, *Colletotrichum acutatum*, *Verticillium dahliae* *Phytophthora cactorum* y *Ramularia tulasnei*, y tolerante a *Tetranychus urticae* (Shaw y Larson 2009)

5.4.2 Manejo del cultivo

Las plántulas utilizadas fueron adquiridas en la empresa Agro del Valle Zamora, previo a su trasplante se mantuvieron en refrigeración a 15°C por 4 días, posteriormente se trasplantaron en bolsas negras rellenas con suelo. Antes del trasplante el suelo se mojó hasta capacidad de campo y se mantuvo así hasta el final del experimento manteniendo las macetas bajo condiciones de invernadero.

5.4.3 Preparación de inóculo

Se preparó una suspensión de conidios de cada hongo en agua destilada y Tween 80 al 0.1% para llevar a cabo el conteo de conidios en la cámara de Neubauer y tener una concentración final de 1×10^6 conidios/mL.

5.4.4 Inoculación

Se aplicaron 15 mL de la suspensión de cada hongo o de la mezcla de ellos directamente en el suelo 24 horas antes del trasplante. Los testigos se inocularon con agua destilada estéril. Previamente se llevó el suelo a capacidad de campo. Las mezclas realizadas se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Mezclas de los hongos más frecuentemente aislados de la secadera de la fresa para probar su patogenicidad en plantas de fresa de las variedades Albión y San Andreas, en Chapingo, Edo de México, 2016.

Tratamiento	Cepa de Hongo	Tratamiento	Cepa de Hongo
1	H1	15	H4+H5
2	H2	16	H1+H2+H3
3	H3	17	H1+H2+H4
4	H4	18	H1+H2+H5
5	H5	19	H2+H3+H4
6	H1+H2	20	H2+H3+H5
7	H1+H3	21	H3+H4+H5
8	H1+H4	22	H4+H3+H1
9	H1+H5	23	H4+H5+H1
10	H2+H3	24	H4+H5+H2
11	H2+H4	25	H5+H3+H1
12	H2+H5	26	Testigo Albion
13	H3+H4	27	Testigo San Andreas
14	H3+H5		

5.4.5 Diseño experimental

Para determinar la patogenicidad de los posibles agentes causales de la secadera de la fresa se tomó en consideración las variables incidencia y severidad, para lo cual se estableció un experimento bajo un diseño experimental completamente al azar, con tres repeticiones y con los resultados obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples de medias de Tukey ($P = 0.05$). Los datos se analizaron en el Programa SAS v.9.0 para Windows.

5.4.6 Realislamiento del agente causal

En las plantas donde se reprodujeron los síntomas de la secadera, se procedió a aislar nuevamente al agente causal, siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado de aislamiento y purificación.

5.5 Identificación morfológica de los agentes causales de la secadera de la fresa.

De los aislamientos que presentaron mayor incidencia y severidad en las pruebas de patogenicidad, se realizaron preparaciones tomando porciones de micelio y esporas, las cuales se tomaron de colonias de siete días de crecimiento en medio de cultivo PDA para su observación al microscopio, y fueron identificados a nivel de género con base en las claves de Barnett y Hunter (1998) y Maharachchikumbura *et al.* (2014), Erwin y Ribeiro (1996) y Sneh (1991).

5.6 Identificación molecular de los agentes causales de la secadera de la fresa y análisis filogenético

5.5.1 Extracción de DNA

Para la extracción de ADN genómico se utilizaron aislamientos de siete días de crecimiento en medio de cultivo PDA, y se utilizó el Kit DNeasy® Plant Mini siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.5.2 Amplificación de genes ribosomales

Para la amplificación de (ITS) se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL (Cuadro 2), con los iniciadores ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990).

Cuadro 2. Componentes y cantidades en la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras de transcripción interna (ITS)

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	1X	5 µL
dNTP's	10 mM	0.5 µL
Primer ITS4	1 mM	1.5 µL
Primer ITS5	1 mM	1.5 µL
<i>Taq</i> DAN Polimerasa	5 U	0.2 µL
ADN	-----	2 µL
H ₂ O (HPLC)	-----	14.3 µL

Las condiciones de amplificación para la mezcla de reacción fue: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 45 °C por 1 minuto y extensión a 72°C por 90 s; y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

5.5.3 Secuenciación de productos de PCR

El producto amplificado fue enviado a secuenciar a la empresa Macrogen (Seoul, Korea). Las secuencias obtenidas se editaron y se creó una secuencia consenso con el software BioEdit versión 7.0.5. Estas secuencias se compararon con las secuencias depositadas en GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

5.5.4 Análisis Filogenético

Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W, la divergencia entre individuos fue cuantificada usando el modelo de distancia Kimura dos parámetros. Se crearon árboles por el Método de Máxima Verosimilitud. El análisis fue realizado con el programa MEGA7 7.0.14.

5.7 Control biológico de la secadera de la fresa

Para llevar a cabo esta fase primeramente se determinó la capacidad antagónica de bacterias sobre los agentes causales de la secadera *in vitro* y posteriormente *in vivo* en plantas de fresa bajo condiciones de invernadero.

5.7.1 Pruebas de antagonismo *in vitro*

5.7.1.1 Evaluación del antagonismo de bacterias sobre los hongos causantes de la secadera de la fresa

Para esta prueba se utilizaron tres bacterias antagónicas (cepa chapingo, cepa N y col BII) pertenecientes a la Colección de Bacterias Antagónicas del Departamento de Parasitología Agrícola, tres de las bacterias se sembraron en cajas Petri con medio B de King en forma de una línea horizontal en el centro de la misma. Posteriormente se incubaron por 48 horas a 28°C. Pasado este tiempo se colocaron dos discos de 0.5 cm de diámetro con crecimiento de siete días de la cepa de hongo, uno a cada lado de la línea del crecimiento bacteriano cercano a las paredes de la caja, también se colocó el hongo en una caja sin bacteria como testigo y se incubaron a temperatura ambiente por una semana. para lo cual se establecieron cuatro tratamientos (Cuadro 3), y cada tratamiento tuvo 3 repeticiones. Diariamente y en todos los tratamientos se midió el crecimiento del hongo con un vernier.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados *in vitro* para evaluar el antagonismo de bacterias de la colección de organismos antagónicos del área de Fitobacteriología del Dpto. de Parasitología Agrícola 2016

Tratamiento	Rizobacteria
1	B1
2	B2
3	B3
4	Testigo

5.7.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Para determinar cuál de los tratamientos fue el que tuvo mayor inhibición se usó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones y el análisis de datos se realizó mediante un análisis estadístico de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de tukey ($P = 0.05$) para la comparación múltiple de medias, se realizó con ayuda del paquete estadístico SAS 9.0 para Windows.

5.8 Fase de invernadero

5.8.1 Establecimiento del experimento en invernadero.

El experimento se estableció en el invernadero de bacterias perteneciente al Departamento de Parasitología Agrícola.

5.8.2 Preparación del inóculo

Se sembraron los hongos en medio PDA y se dejaron crecer por siete días a temperatura ambiente ($\pm 28^\circ$), posteriormente se agregó agua destilada estéril a las cajas para recolectar los conidios, y la suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios/mL.

5.8.3 Preparación de bacterias antagónicas

Las cepas bacterianas se sembraron en cajas Petri en medio B de King por 24 horas, estas se transfirieron a 1L de medio líquido B de King y fueron incubadas a 28°C por 96 horas en agitación constante. La concentración aproximada del inóculo fue de 1×10^8 UFC/mL. Estos crecimientos fueron utilizados como suspensiones madre y de aquí se tomaron las alícuotas para aplicar a las plantas.

Se realizaron aplicaciones constantes cada 21 días en dosis de 10 mL/L de agua

5.8.4 Trasplante

Se utilizaron bolsas de 15 L de capacidad las cuales se llenaron con suelo previamente tratado con Busan 30W, se adicionaron 45 mL de la suspensión del inóculo por bolsa, 24 horas después se trasplantaron tres plántulas por bolsa de la variedad Albion previamente inoculadas (por inmersión de la raíz) con las bacterias.

5.8.5 Tratamientos

Para el control de la secadera de la fresa, se establecieron nueve tratamientos para cada hongo y la mezcla de ellos, los cuales se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados *in vivo* para evaluar el antagonismo de bacterias de la colección de organismos antagónicos del área de Fitobacteriología del Dpto. de Parasitología Agrícola 2016.

Tratamiento	Rizobacteria
1	B1
2	B2
3	B3
4	B1+B2
5	B1+B3
6	B2+B3
7	B1+B2+B3
8	Testigo enfermo
9	Testigo comercial

5.8.6 Variables a evaluar

5.8.6.1 Incidencia de la enfermedad

Se evaluó durante el desarrollo del cultivo, para lo cual se considerará el número de plantas con síntomas de secadera, así como, número de plantas muertas, en relación al número total de plantas por tratamiento.

5.8.6.2 Severidad de la enfermedad

La severidad se estimó de manera visual durante el ciclo del cultivo mediante una escala arbitraria de daño con valores: 0 (planta sana), 1 (planta con ligera marchitez), 2 (planta con marchitez moderada) y 3 (planta muerta). Los valores de severidad se transformaron en porcentajes de infección con la Fórmula de Townsend y Heuberger (1943).

$$\%Infección = \frac{\sum n \times v}{N} \times 100$$

Donde: n= número de plantas por categoría

v= valor numérico de cada categoría

N= número total de plantas en el tratamiento

i= categoría de mayor escala

5.8.7 Diseño experimental y análisis estadístico

Para determinar cuál de las rizobacterias ejerce la mayor inhibición se usó un diseño experimental completamente al azar, cada tratamiento tuvo cinco

unidades experimentales con tres individuos por unidad experimental para cada hongo y su mezcla. Con los valores obtenidos se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de tukey ($P = 0.05$) para la comparación múltiple de medias, con el paquete SAS versión 9.0 para Windows

5.8.8 Eficacia de los tratamientos

Con los datos de severidad, se calculó el porcentaje de eficacia de los tratamientos, aplicando la fórmula de Abbot.

$$\%E = (IT - it \times 100) / IT$$

Donde: IT = Infestación del testigo

it = infestación del tratamiento

6. RESULTADOS

6.1 Frecuencia de aislamiento de hongos asociados a la secadera de la fresa

En los muestreos realizados el 13 de febrero, 4 de marzo y 9 de abril del 2016 en el rancho Agro del Valle Zamora se encontraron plantas de fresa con síntomas de secadera y un gran número de plantas muertas, en las cuales se observó una reducción del tamaño y cantidad de follaje, además de la falta de floración y/o fructificación. Las hojas periféricas completamente secas, y las centrales de color amarillo comenzado a secarse de los bordes hacia el centro y la corona con una coloración marrón claro (Fig. 1), lo cual indica una obstrucción de los haces vasculares.



Figura 1. Planta de fresa con síntomas de secadera, en Jacona, Michoacán, 2016

En los dos primeros muestreos se aislaron siete hongos, a los cuales se les designo como H1-H7, en el primer muestreo el H1 tuvo la mayor frecuencia de aislamiento con el 30% seguido del H2 con el 19%, mientras que en el segundo H1 tuvo el 25% y H2 el 20%, en el tercer muestreo solo se aislaron seis de los siete hongos aislados anteriormente, y el H2 presentó mayor frecuencia con 27%

y el H1 bajo a 23%. A lo largo de los muestreos H1, H5 y H7 mostraron disminución en la frecuencia de aislamiento y H2, H3 y H4 un incremento, mientras que H6 se mantuvo sin cambios (Cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencia de aislamiento de hongos asociados a la secadera en diferentes muestreos en Jacona, Michoacán, 2016

Hongo	Frecuencia (%)		
	Muestreo 13-02-16	Muestreo 04-03-16	Muestreo 09-04-16
1	30	25	23
2	19	20	27
3	15	19	20
4	11	15	16
5	15	12	9
6	5	5	5
7	5	4	0

De las 150 plantas recolectadas en los tres muestreos con síntomas de secadera la frecuencia promedio obtenida fue la siguiente; 26% correspondió a H1, el 22% a H2, el 18% a H3, el 14% a H4, el 12% a H5, el 5% a H6 y el 3% a H7 (Fig. 2) .

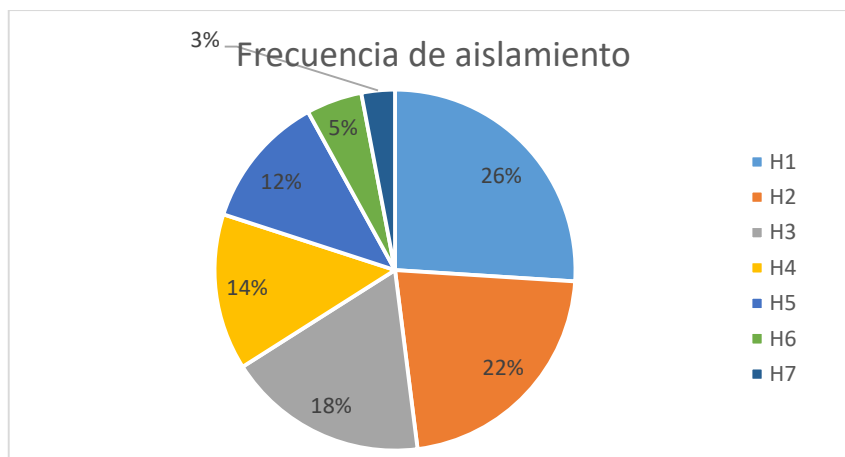


Figura 2. Frecuencia de aislamiento de hongos asociados a la secadera de la fresa en Jacona Michoacán 2016.

6.1.1 Descripción morfológica de los hongos aislados en medio de cultivo PDA

6.1.1.1 Hongo H1

En medio de cultivo PDA se observaron colonias con micelio blanco algodonoso, de bordes circulares y ondulados (Fig. 3A), formo acérvulos de color negro, que surgieron a los 12 días, presentó micelio septado, conidios fusiformes a elipsoides de cinco células. La célula apical hialina con tres apéndices apicales, la segunda célula se observó de color café pálido, la tercera de color café oscuro y la cuarta de color café claro, y las células basales hialinas con un apéndice basal (Fig. 3B), características típicas del género *Neopestalotiopsis* (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

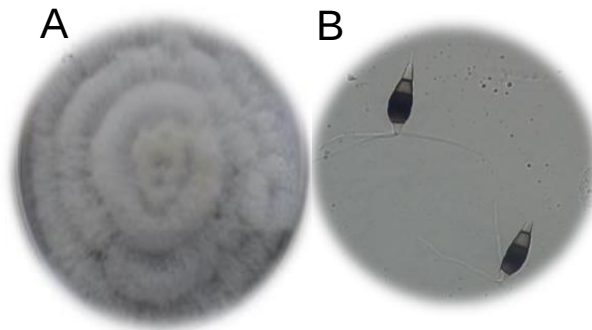


Figura 3 . A) Crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de conidios de *Neopestalotiopsis* spp.

6.1.1.2 Hongo H2

Este hongo presentó colonias de micelio algodonoso, de color crema (Fig. 4A), micelio septado y microconidios abundantes de forma ovoide y hialinos producidos en fiálides largas. Se observaron pocos macroconidios curvados con uno a cuatro septos (Fig. 4B) y clamidosporas globosas, características pertenecientes al género *Fusarium* (Barnett y Hunter, 1998).

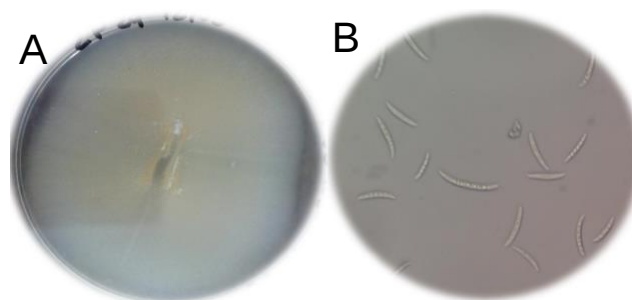


Figura 4. A) Crecimiento de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de macroconidios de *Fusarium* spp

6.1.1.3 Hongo H3

Produjo colonias de micelio de color rosa púrpura que al invadir todo el espacio se tornaron violeta (Fig. 5A), presentó micelio septado, microconidios ovoides y hialinos producidos en fiálides cortas (Fig. 5B), macroconidios ligeramente curvados con tres a cinco septos, y clamidosporas terminales o intercalares características correspondientes al género *Fusarium* con base en las características descritas por Barnett y Hunter (1998).



Figura 5. A) Crecimiento de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de microconidios de *Fusarium* spp

6.1.1.4 Hongo H4

La colonia en medio de cultivo PDA presentó micelio de color blanco, algodonoso (Fig. 6A), microconidios ovoides y hialinos (Fig. 6B) formados en macro fialides en cabezas falsas en fialides laterales y simples, macroconidios ligeramente curvados y clamidosporas terminales o intercalares. Estas características coinciden con el género *Fusarium* descrito por Barnett y Hunter (1998).

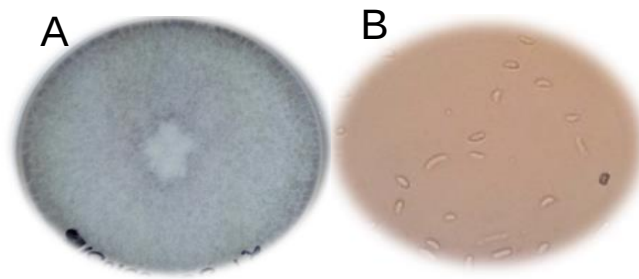


Figura 6. A) Crecimiento de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de microconidios de *Fusarium* spp.

6.1.1.5 Hongo H5

Este hongo formó colonias de micelio color amarillo, de textura algodonosa y márgenes ondulados (Fig. 7A), produjo abundantes acérvulos de color negro 12 días después de la siembra. Presentó conidios fusiformes a elipsoides de cinco células. La célula apical hialina con cinco apéndices apicales, la segunda célula se observó de color café pálido, la tercera de color café oscuro y la cuarta de color café claro, y las células basales hialinas con solo un apéndice basal (Fig. 7B).

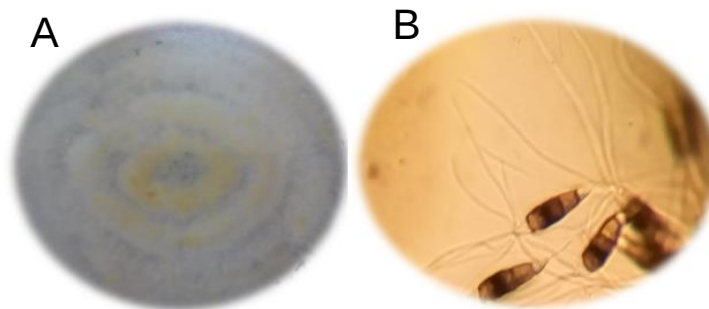


Figura 7. A) Crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. en medio de cultivo PDA. B) Microfotografía (40X) de conidios de *Neopestalotiopsis* spp.

6.1.1.6 Hongo H6

Produjo colonias blancas, micelio cenocítico sumergido en el medio, formó oogonios con anteridios paráginos y esporangios hialinos globosos sin papila o semipapilados, características que coinciden con las descritas por Erwin y Ribiero (1996) como pertenecientes al género *Phytophthora*.

6.1.1.7 Hongo H7

Se observaron colonias blancas, con ramificaciones desarrolladas en ángulo recto (90°) (Fig. 8) e hifas binucleadas descripción que pertenece al género *Rhizoctonia* (Sneh, 1991).



Figura 8. Microfotografía (40X) de micelio de *Rhizoctonia* spp.

6.2 Pruebas de patogenicidad

6.2.1 Incidencia

Las plantas de la variedad Albion, inoculadas con los hongos H1 y H4, a los diez días de la inoculación empezaron a mostrar amarillamiento del follaje (Fig. 9A), seguida de la necrosis marginal (Fig. 9B) y de menor tamaño a diferencia de los

testigos sanos cuyo follaje se mantuvo verde y con buen desarrollo (Fig. 9 C).



Figura 9. A) Planta de fresa variedad Albión con amarillamiento. B) Planta de fresa variedad Albión con necrosis en los bordes de las hojas. C) Planta de fresa variedad Albion sana

A los 20 días después del trasplante (ddt), al determinar la incidencia de la enfermedad se encontró un 100% de incidencia cuando los hongos se aplicaron solos, excepto en el H5, donde se presentó solo el 66%. Cuando los hongos se aplicaron en mezcla de dos, se presentaron incidencias mayores al 50% en todas excepto en las mezclas H2+H5 y H3+H5, 33 y 0% respectivamente. Al aplicar las mezclas de tres hongos, en la mayoría se observaron incidencias del 100% a excepción de las mezclas H2+H3+H4 con el 66%, y H2+H3+H5 y H5+H3+H1 con el 33% de incidencia (Fig. 10). A los 40 ddt las mezclas H2+H3, H2+H5, H3+H5 y H5+H3+H1 no alcanzaron el 100% de incidencia, pero a los 60 ddt en todos los tratamientos se presentaron síntomas en el 100% de las plantas.

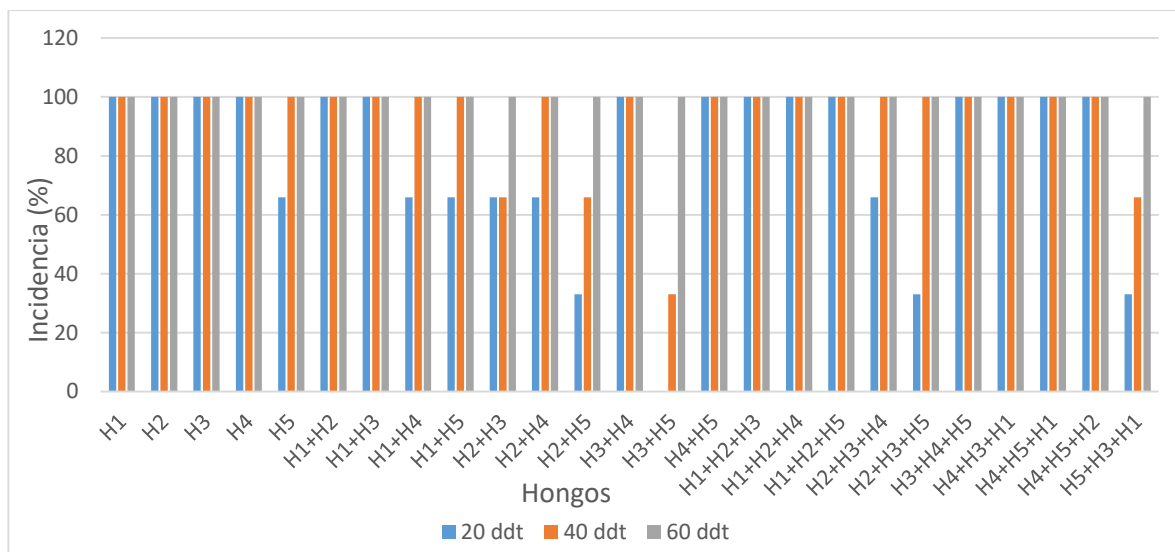


Figura 10. Porcentaje de incidencia de los hongos que ocasionan la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, a los 20, 40 y 60 ddt sobre plantas de fresa variedad Albión.

En la variedad San Andreas, al aplicar solo un hongo la incidencia fue del 100% desde los primeros 20 ddt, mientras que al aplicar las mezclas de dos hongos en los primeros 20 ddt solo se observaron síntomas en las mezclas H1+H3, H2+H3, H3+H5 con el 100% de incidencia y H3+H4 con el 33%, cuando se aplicaron mezclas de tres hongos estas presentaron el 100% de incidencia a excepción de H1+H2+H4, H2+H3+H4 y H4+H3+H1 con el 66% y H1+H2+H5 sin síntomas.

A los 40 ddt en las mezclas de los hongos H1+H3, H2+H3 y H3+H5 se presentó el 100% de incidencia y en las mezclas H1+H4 y H1+H5 un 33 % y en el resto en las mezclas no manifestaron síntoma. En la aplicación de tres hongos la mezcla H1+H2+H5 presentó un 33% de incidencia, H1+H2+H4 y H2+H3+H4 un 66% y el resto de las mezclas presentaron 100% de incidencia. A los 60 ddt solo se

incrementó la incidencia en tres tratamientos con respecto a la evaluación anterior, en la mezcla H1+H4 con el 33% de incidencia, y en H3+H4 y H2+H3+H4 con el 66 y 100% respectivamente (Fig. 11).

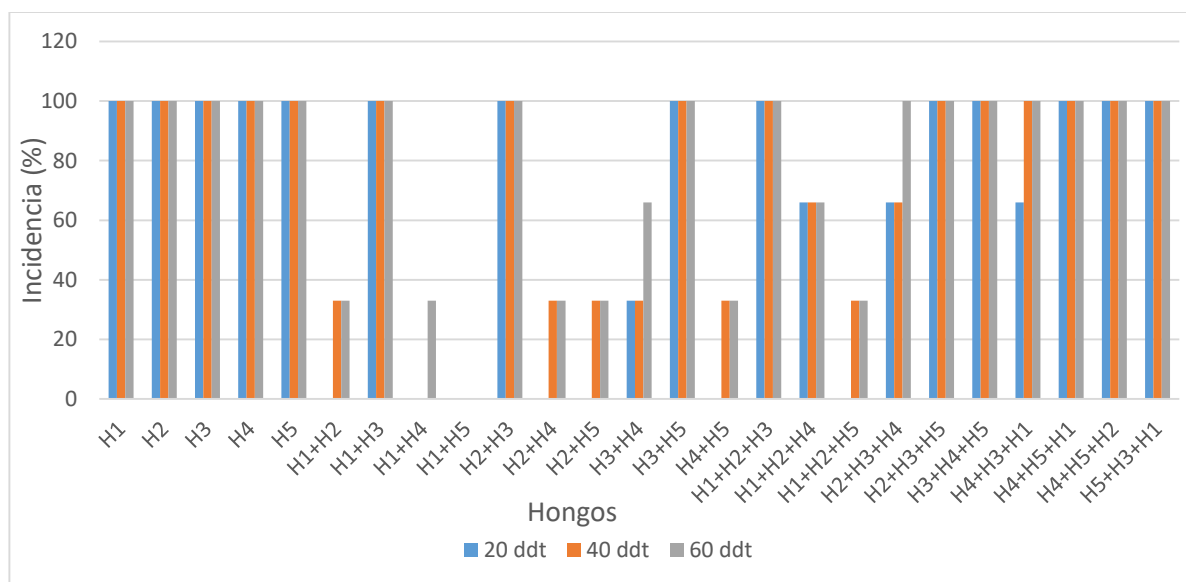


Figura 11. Porcentaje de incidencia de los hongos que ocasionan la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, a los 20, 40 y 60 ddt sobre plantas de fresa variedad San Andreas.

6.2.2 Severidad

Para evaluar la virulencia de los hongos asilados con mayor frecuencia de plantas con síntomas de secadera se midió el porcentaje de severidad, en la primer evaluación a los 20 ddt en la variedad Albión se observó la mayor severidad al aplicarse los hongos H1 y H4 con un 93.33 y 100% respectivamente, al aplicarse en mezcla de dos la mayor severidad se presentó en las mezclas conformadas por H1+H3 y H4+H5 ambas con el 100%, mientras que en las mezclas de tres hongos la mayor severidad se observó en H3+H4+H5 y H1+H2+H3 con el 93.33

y 100% respectivamente con clara diferencia significativa con respecto al testigo ($P < 0.05$). En las dos evaluaciones siguientes, se observó un incremento en el porcentaje de severidad en todos los tratamientos; sin embargo, en los seis tratamientos citados anteriormente, se mantuvieron como los más agresivos. Los tratamientos en los que se presentó menor porcentaje de severidad, fueron las mezclas H3+H5 y H2+H3+H5 con un 20 y 23.33% respectivamente (Cuadro 6).

En la variedad San Andreas, a los 20 ddt, los tratamientos con mayor severidad fueron H1, H2 y H4, con el 86.67, 99.33, 85% respectivamente, en la mayoría de las mezclas de dos hongos registraron severidad por debajo del 15% a excepción de H2+H3 y H3+H5 con 35 y 46.67% respectivamente, mientras que en las mezclas de tres hongos las mezclas H2+H3+H5 y H5+H3+H1 presentaron la mayor severidad con 55 y 53.33% respectivamente. En la tercera fecha de evaluación se observó un incremento en el porcentaje de severidad en todos los tratamientos, con excepción de la mezcla H1+H2 la cual no mostro síntomas. En la última evaluación los tratamientos con mayor severidad fueron H1 y H4 con el 95% y H2 y H5 con el 100% de severidad, y las mezclas H3+H4+H5 y H5+H3+H1 con 80 y 76.67% respectivamente (Cuadro 7).

Debido a que en la variedad Albión se presentó el 100% de incidencia y la severidad de todos los tratamientos fue mayor que en la variedad San Andreas, se decidió trabajar con esta variedad en el experimento en invernadero, así como, con los hongos H1 y H4 al ser los que ocasionaron mayor daño en la variedad Albión.

Cuadro 6. Medias de porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad Albión en diferentes fechas en Jacona, Michoacán, 2016

Tratamiento	Severidad (%)		
	20 ddt	40 ddt	60 ddt
H1	61.67 abcd*	78.33 abc	93.33 a
H2	70.0 abcd	70.0 abcd	70.0 ab
H3	80.0 abc	83.33 ab	83.33 ab
H4	100 a	100 a	100 a
H5	68.33 abcd	71.67abcd	80.0 ab
H1+H2	70.0 abcd	71.67 abcd	73.33 ab
H1+H3	100 a	100 a	100 a
H1+H4	76.67 abc	78.33 abc	80.0 ab
H1+H5	66.67 abcd	71.67 abcd	75.0 ab
H2+H3	60.0 abcd	61.67 abcd	63.33 ab
H2+H4	68.33 abcd	71.67 abcd	73.33 ab
H2+H5	18.33 bcd	25.0 bcd	40.0 ab
H3+H4	96.0 a	98.33 a	98.33 a
H3+H5	5.0 d	15.0 d	20.0 b
H4+H5	100 a	100 a	100 a
H1+H2+H3	100 a	100 a	100 a
H1+H2+H4	40.0 abcd	53.33 abcd	68.33 ab
H1+H2+H5	61.67 abcd	63.33abcd	68.33 ab
H2+H3+H4	20.0 bcd	28.33 bcd	35.0 ab
H2+H3+H5	16.67 bcd	20.0 cd	23.33 b
H3+H4+H5	93.33 a	96.67 a	98.33 a
H4+H3+H1	61.67 abcd	70.0 abcd	78.33 ab
H4+H5+H1	56.67 abcd	61.67 abcd	66.67 ab
H4+H5+H2	83.33 ab	85.0 ab	91.67 ab
H5+H3+H1	20.0 bcd	28.33 bcd	43.33 ab
Testigo	0.00 d	0.00 d	0.00 b
CV	32.68	29.17	28.16
DMS	65.99	62.93	65.03

ddt: días después del trasplante, *medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa

Cuadro 7. Medias de porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad San Andreas en diferentes fechas en Jacona, Michoacán, 2016.

Tratamiento	Severidad (%)		
	20 ddt	40 ddt	60 ddt
H1	86.67 ab*	90.00 ab	95.00 ab
H2	99.33 a	100.0 a	100.0 a
H3	51.67 abcd	58.33 abcd	66.67 abc
H4	85.00 ab	86.67 ab	95.00 ab
H5	69.33 abc	88.33 ab	100.0 a
H1+H2	0.0 d	1.67 e	3.33 e
H1+H3	7.67 cd	23.33 cde	36.67 cdef
H1+H4	0.0 d	0.0 e	1.67 ef
H1+H5	0.0 d	0.0 e	0.0 f
H2+H3	35.00 abcd	40.00 bcde	50.00 dcde
H2+H4	0.0 d	1.67 e	3.33 ef
H2+H5	0.0 d	3.33 e	5.00 dcef
H3+H4	13.33 cd	26.67 cde	33.33 cdef
H3+H5	46.67 abcd	53.33 abcde	60.00 abc
H4+H5	0.0 d	3.33 e	5.00 ef
H1+H2+H3	30.00 bcd	40.00 bcde	45.00 cdef
H1+H2+H4	21.67 bcd	38.33 bcde	41.67 cdef
H1+H2+H5	0.0 d	5.00 de	8.33 def
H2+H3+H4	36.67 abcd	46.67 abcde	55.00 abcd
H2+H3+H5	55.00 abcd	65.00 abc	73.33 abc
H3+H4+H5	45.00 abcd	66.67 abc	80.00 abc
H4+H3+H1	11.67 cd	23.33 cde	31.67 cdef
H4+H5+H1	25.00 bcd	45.00 bcde	63.33 abc
H4+H5+H2	38.33 abcd	50.00 abcde	56.67 abcd
H5+H3+H1	53.33 abcd	66.67 abc	76.67 abc
Testigo	0.00 d	0.00 e	0.00 f
CV	66.33	42.20	32.58
DMS	68.16	54.71	48.95

ddt: días después del trasplante, *medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa.

6.3 Identificación molecular de los agentes causales de la secadera de la fresa

La secuencia parcial de ITS fue obtenida para el aislamiento H4 con un producto de 540 pb, el análisis mostró que el aislamiento se agrupó con las secuencias seleccionadas del GenBank del genero *Fusarium* y la especie *oxysporum* (Análisis de Máxima Verosimilitud; apoyado en 100% de rama y 1000 réplicas de bootstrap), sin embargo la matriz muestra que al comparar entre secuencias existen algunas variaciones como se muestra en la figura 12.

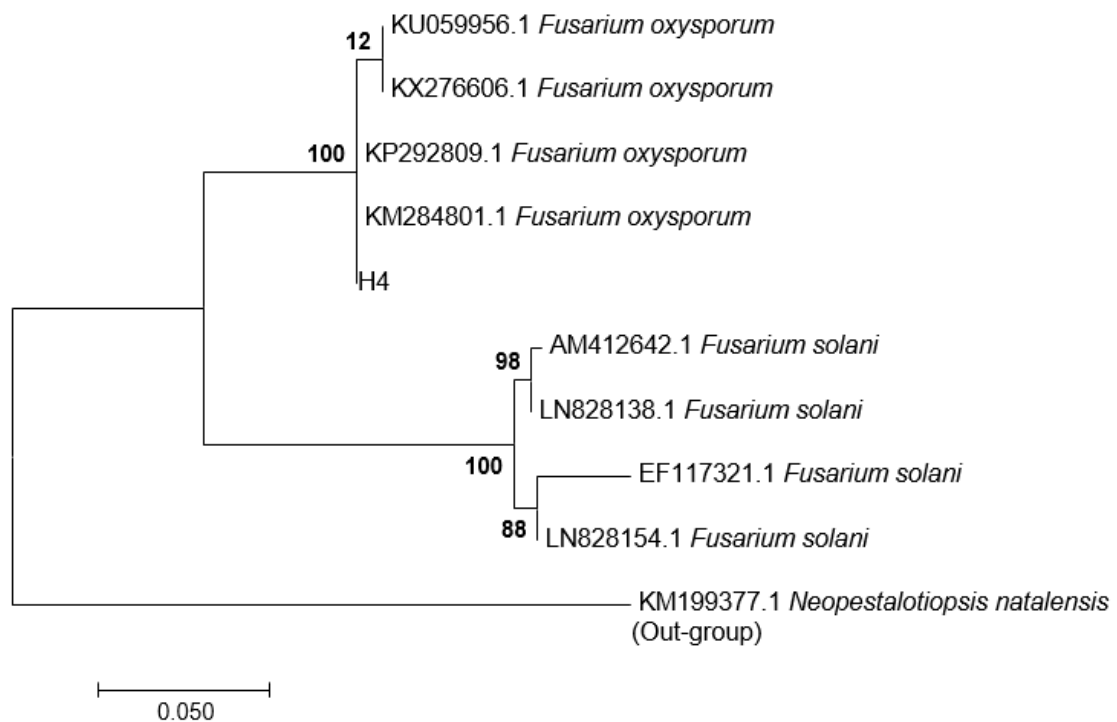


Figura 12. Árbol filogenético del aislamiento H4 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, basado en el modelo Kimura 2-parámetros.

En el caso del aislamiento H1 se obtuvieron 561 pares de bases, el análisis mostró que el aislamiento se agrupó con las secuencias seleccionadas del GenBank en el género *Neopestalotiopsis* (Análisis de Máxima Verosimilitud; apoyado en 79% de rama y 1000 réplicas de bootstrap) y una variación de 13 % con la especie *nataliensis* (Figura 13).

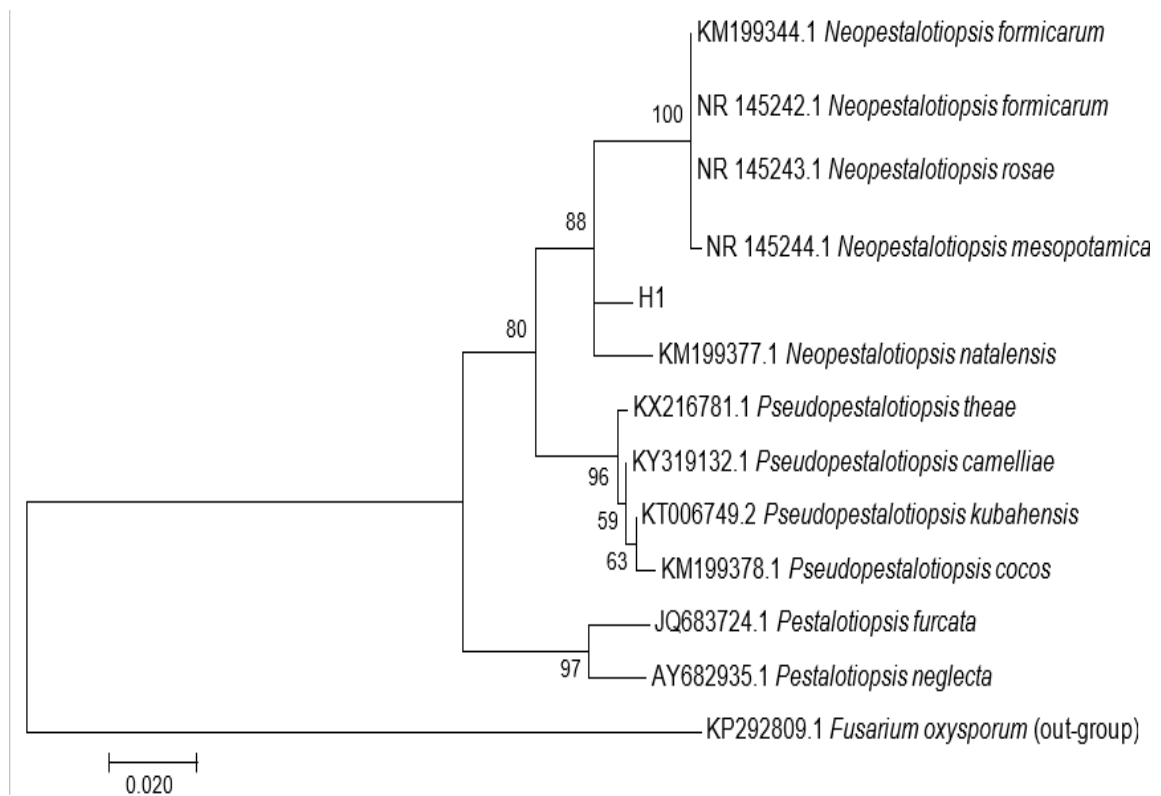


Figura 13. Árbol filogenético del aislamiento H1 inferido desde Máxima verosimilitud (ML) y 1000 réplicas de Bootstrap, basado en el modelo Kimura 2-parámetros

6.4 Pruebas de antagonismo *in vitro*

6.4.1 *Fusarium*

En los resultados de las pruebas *in vitro* para evaluar el antagonismo de rizobacterias contra *F. oxysporum* se observó que a las 24 horas, las cepas N y Col BII, inhibieron el crecimiento del hongo, pero la cepa chapingo no mostro efecto, al segundo día las tres cepas inhibieron el desarrollo micelial, destacando la N con un 53.7%, mientras que la cepa Col BII inhibió un 9.3% y la cepa chapingo solo 1%. A lo largo de los días, las tres cepas incrementaron la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*, siendo N, la cepa que presentó mayor inhibición al final del experimento (68.8%) seguida de Col BII con el 58.9% y finalmente la cepa chapingo (Fig. 14) con solo un 54.2% (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum* agente causal de la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, con rizobacterias antagonistas

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Col BII	2.0	9.3	15.5	17.3	25.7	37.1	58.9
chapingo	0.0	1.0	11.7	28.6	43.1	44.0	54.2
N	57.9	53.7	55.6	58.2	60.6	66.8	68.8

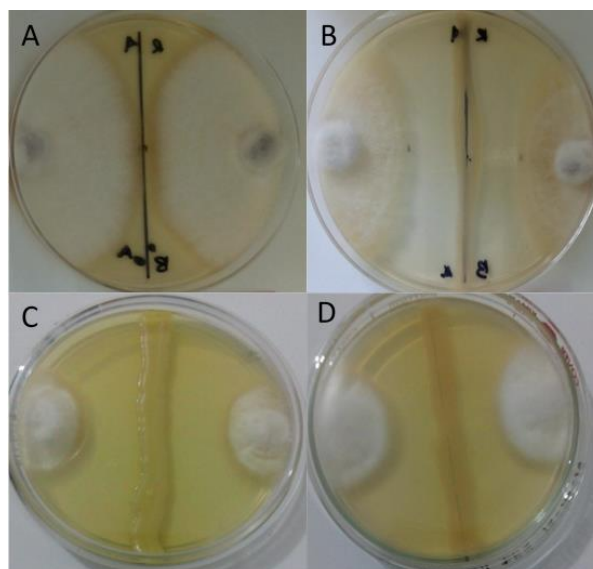


Figura 14. Efecto antagónico de las rizobacterias contra *F. oxysporum* en medio de cultivo B de King a los siete días. (A) Tratamiento testigo del crecimiento de *F. oxysporum* (B) Inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* por la cepa chapingo. (C) Inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* por la cepa N. (D) Inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* por la cepa Col BII.

6.4.2 *Neopestalotiopsis*

En la evaluación de rizobacterias antagónicas para el control *in vitro* de *Neopestalotiopsis* spp. a las 24 hora de haberlo establecido, ninguna cepa mostro inhibición del hongo, pero a partir del segundo día, se observó inhibición con las tres cepas, a lo largo de los días la cepa chapingo fue incrementado su capacidad de inhibir el crecimiento del hongo mostrándose como la mejor cepa con un 49.8%, mientras que la cepa Col BII, presento un comportamiento irregular ya que al cuarto día su capacidad de inhibición fue de un 25.2%; sin embargo, a partir del quinto día, este efecto fue disminuyendo, de tal manera que al sexto día solo había un 10.5% de inhibición, pero al día siete volvió a incrementar a

17.9% de inhibición. Así mismo, la cepa N tuvo un comportamiento similar al de la cepa Col BII, ya que al día tres presentó un 47.2% de inhibición y al día sexto día disminuyó hasta llegar a 36.7% y finalmente volvió a incrementar a 37% al final del experimento (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento *in vitro* de *Neopestalotiopsis* spp. agente causal de la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, 2016, con rizobacterias antagonistas

Tratamiento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Col BII	0	6.0	24.4	25.2	20.0	10.5	17.9
chapingo	0	4.0	21.1	40.5	43.2	43.8	49.8
N	0	26.0	47.2	46.6	45.8	36.7	37.0

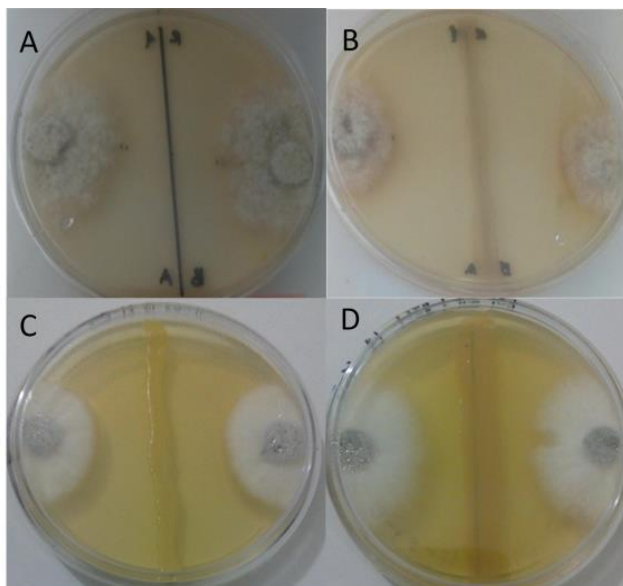


Figura 15. Efecto antagónico de las rizobacterias contra *Neopestalotiopsis* spp. en medio de cultivo B de King a los siete días. (A) Tratamiento testigo del crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. (B) Inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. por la cepa chapingo. (C) Inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. por la cepa N. (D) Inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. por la cepa Col BII.

6.5 Pruebas de antagonismo *in vivo*

6.5.1 Incidencia

6.5.1.1 *Fusarium*

Al evaluar el efecto antagonista *in vivo* de las rizobacterias solas y en mezcla contra *F. oxysporum*, los datos muestran que en las tres primeras evaluaciones no hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los diferentes

tratamientos y el testigo, aunque en la tercer evaluación la cepa N y la mezcla de N + chapingo presentaron 46.8% menos de incidencia que el testigo enfermo. En la cuarta evaluación se observó un incremento en el porcentaje de incidencia en todos los tratamientos, excepto en la mezcla de las cepas chapingo + N, la cual mantuvo constante su porcentaje de severidad (46.4%) hasta la última evaluación, sin embargo la incidencia en las cepas chapingo y N al aplicarse solas fue diferente al comportamiento de la mezcla ya que no hubo diferencia estadística significativa en la incidencia ocasionada por chapingo y el testigo enfermo llegando en la última evaluación al 100% y la cepa N tampoco tuvo diferencia con el testigo enfermo a lo largo del tiempo.

En general las mezclas conformadas por dos bacterias fueron las que presentaron menor incidencia, siendo el mejor tratamiento la mezcla de chapingo + N, mientras que la cepa chapingo y la mezcla de las tres rizobacterias fueron los tratamientos en los que se observó mayor porcentaje de severidad teniendo el 100% de incidencia al final de experimento al igual que el testigo enfermo y comercial (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por *F. oxysporum* en Jacona, Michoacán, 2016.

Tratamiento	% de incidencia					
	09-mar	23-mar	06-abr	20-abr	04-may	18-may
N	26.4 a*	39.6 a	46.4 a	66.4 ab	86.6 ab	86.6 ab
Col BII	46.2 a	59.4 a	72.8 a	86.4 ab	86.4 ab	93.2 a
chapingo	66.4 a	66.4 a	73.0 a	79.6 ab	86.4 ab	100.0 a
Col BII +chapingo	52.8 a	59.4 a	59.4 a	73.0 ab	79.6 ab	79.6 ab
chapingo+N	39.6 a	46.4 a	46.4 a	46.4 b	46.4 b	46.4 b
Col BII+N	39.6 a	46.4 a	66.2 a	73.0 ab	79.8 ab	79.8 ab
Mezcla de 3 Tes	79.6 a	79.6 a	86.4 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
comercial	66.2 a	79.6 a	93.2 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
Tes enfermo	73.0 a	79.6 a	93.2 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
DMS	53.46	54.74	50.16	45.64	48.14	43.36
CV	46.75	42.14	33.7	26.73	27.18	23.64

*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa

6.5.1.2 *Neopestalotiopsis*

Después de la aplicación de las rizobacterias antagónicas para el control *in vivo* de *Neopestalotiopsis* spp. se observó que en la primer evaluación si hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tratamientos y el testigo enfermo, donde los tratamientos con menor incidencia fueron la cepa N y la mezcla de Col BII + N con 13.2 y 26.4% respectivamente. A lo largo de las demás

evaluaciones todos los tratamientos incrementaron su porcentaje de incidencia y los datos indican que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$), sin embargo la cepa Col BII y la mezcla Col BII + N presentaron 33.6 y 27% menos incidencia que el testigo enfermo (Cuadro 11).

Cuadro 11. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por *Neopestalotiopsis* spp. en Jacona, Michoacán, 2016.

Tratamiento	% de incidencia											
	09-mar		23-mar		06-abr		20-abr		04-may		18-may	
N	13.20	b*	26.60	a	33.20	a	59.60	a	59.60	a	93.20	a
Col BII	33.00	ab	46.40	a	53.00	a	59.80	a	59.80	a	66.40	a
chapingo	79.80	a	86.6	a	86.60	a	86.60	a	86.60	a	86.60	a
Col BII +chapingo	46.40	ab	59.60	a	66.40	a	79.80	a	86.60	a	86.60	a
chapingo+N	46.20	ab	52.80	a	66.40	a	80.00	a	86.60	a	86.60	a
Col BII+N	26.40	ab	53.00	a	59.60	a	66.20	a	66.20	a	73.00	a
Mezcla de 3 Tes	46.20	ab	52.8	a	73.00	a	93.20	a	100.0	a	100.0	a
comercial	53.00	ab	59.6	a	66.20	a	60.80	a	100.0	a	100.0	a
Tes enfermo	73.00	ab	79.6	a	86.40	a	93.20	a	100.0	a	100.0	a
DMS	64.02		66.95		69.25		65.78		53.34		50.52	
CV	65.73		55.46		50.21		41.48		30.66		27.31	

*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa

6.5.1.3 *Fusarium* + *Neopestalotiopsis*

En la primer evaluación de los tratamientos inoculados con rizobacterias contra la infección de *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. los resultados muestran que hay diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al testigo enfermo, las mezclas Col BII + chapingo y Col BII + N fueron los tratamientos en los que se presentó mayor incidencia con 79.8 y 73% respectivamente sin haber diferencia estadística significativa con el testigo enfermo y la mezcla de las tres rizobacterias la que presento menor incidencia (6.6%). En la segunda evaluación la mezcla de las cepas chapingo + N, N, chapingo y testigo comercial tuvieron un incremento en la incidencia, mientras que los demás tratamientos mantuvieron el mismo porcentaje de incidencia que en la evaluación pasada. El testigo comercial, N y las mezclas Col BII + chapingo y Col BII + N fueron los tratamientos con mayor porcentaje de incidencia, sin diferencia estadística significativa entre ellos y el testigo enfermo, mientras que la mezcla de tres rizobacterias y la mezcla chapingo + N fueron los tratamientos que presentaron menor porcentaje de incidencia (6.6 y 46.4% respectivamente) y fueron estadísticamente diferentes al testigo enfermo.

En la tercer evaluación las tres mezclas formadas por dos rizobacterias mantuvieron los mismos porcentajes de incidencia, en los demás tratamientos se observa un incremento en el porcentaje de incidencia, solo el tratamiento conformado por las tres rizobacterias fue estadísticamente diferente al testigo enfermo, el segundo tratamiento con menor porcentaje de incidencia fue la

mezcla chapingo + N con un 53.6% menos incidencia que el testigo enfermo aunque no presento diferencia estadística diferente con este. En la evaluación con fecha del 20 de abril, todos los tratamientos incrementaron sus porcentajes de incidencia a excepción de las mezclas Col BII + chapingo y chapingo + N, las cuales mantuvieron el mismo porcentaje desde la segunda evaluación, las mezclas de las tres rizobacterias y chapingo + N se mantuvieron como los tratamientos con menor incidencia y estadísticamente diferentes al testigo enfermo. En la penúltima evaluación todos los tratamientos incrementaron su porcentaje de incidencia a excepción de N y la mezcla Col BII + N.

En la última evaluación los tratamientos con mayor incidencia fueron la cepa chapingo que alcanzó el 100% de incidencia, seguida de la mezcla Col BII + chapingo, las cepas N y Col BII con un 93.2, 93.2 y 84.6% respectivamente sin haber diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con el testigo enfermo, y los tratamientos que mostraron menor porcentaje de incidencia fueron la mezcla de las tres rizobacterias con 46.4% de incidencia, la cual fue estadísticamente diferente al testigo enfermo y la mezcla chapingo + N la cual presentó 40.4% menos incidencia que el testigo enfermo aunque sin diferencia estadística diferente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albi3n causadas por los pat3genos *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. en Jacona, Michoac3n, 2016

Tratamiento	% de incidencia											
	09-mar		23-mar		06-abr		20-abr		04-may		18-may	
N	59.6	ab*	79.6	a	86.4	a	93.2	ab	93.2	ab	93.2	a
Col BII	66.4	ab	66.4	ab	73.2	ab	79.8	abc	86.4	ab	86.4	ab
chapingo	53.0	ab	66.2	ab	73.0	ab	79.8	abc	86.6	ab	100.0	a
Col BII												
+Chapingo	79.8	a	79.8	a	79.8	a	79.8	abc	86.4	ab	93.2	a
chapingo+N	39.6	ab	46.4	ab	46.4	ab	46.4	bc	53.0	ab	59.6	ab
Col BII+N	73.0	a	73.0	a	73.0	ab	79.8	abc	79.8	ab	79.8	ab
Mezcla de 3	6.6	b	6.6	b	19.8	b	36.9	c	46.4	b	46.4	b
Tes comercial	66.6	ab	86.6	a	93.2	a	93.2	ab	100.0	a	100.0	a
Tes enfermo	86.6	a	86.6	a	100.0	a	100.0	a	100.0	a	100.0	a
DMS	66.34		60.31		56.4		53.31		49.46		41.75	
CV	53.51		43.7		37.47		33.01		28.96		23.57	

*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variaci3n, DMS: diferencia m3nima significativa

6.5.2 Severidad

6.5.2.1 *Fusarium*

Los resultados obtenidos en la aplicaci3n de bacterias antag3nicas para el control *in vivo* de *F. oxysporum* muestran que no hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) del porcentaje de severidad en las primeras cuatro evaluaciones con respecto al testigo; sin embargo, se observaron incrementos a lo largo del tiempo

en la severidad en todos los tratamientos, en la evaluación del 20 de abril el testigo comercial y la mezcla de las tres cepas tuvieron 1.33 y 10.33% más incidencia que el testigo enfermo. En la quinta evaluación se observaron incrementos en los porcentajes de severidad en todos los tratamientos. La mezcla chapingo + N y la cepa N tuvieron diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con el testigo enfermo, los cuales presentaron menor porcentaje de severidad (46 y 46.7% respectivamente) y el testigo comercial y la mezcla de las tres cepas fueron los tratamientos con mayor porcentaje de severidad.

En la última evaluación hubo incremento en el porcentaje de severidad de la mayoría de los tratamientos y al igual que en la evaluación pasada los tratamientos que presentaron menor porcentaje de severidad fueron la mezcla de chapingo + N y N (Cuadro 13).

Cuadro 13. Comparación de medias del porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por el patógeno *F. oxysporum* en Jacona, Michoacán, 2016.

Tratamiento	% de severidad					
	09-mar	23-mar	06-abr	20-abr	04-may	18-may
N	5.00 a*	17.33 a	26.00 a	45.00 a	46.67 b	49.33 b
Col BII	14.33 a	35.33 a	49.00 a	70.00 a	72.00 ab	73.33 ab
chapingo	17.00 a	43.00 a	57.33 a	72.00 a	74.00 ab	77.33 ab
Col BII +chapingo	11.00 a	34.67 a	46.00 a	69.33 a	69.67 ab	70.33 ab
chapingo+N	10.66 a	25.00 a	35.00 a	45.67 a	46.00 b	46.00 b
Col BII+N	7.33 a	23.00 a	33.00 a	51.67 a	53.53 ab	56.53 ab
Mezcla de 3	17.67 a	45.67 a	64.67 a	80.00 a	82.53 ab	84.87 ab
Tes comercial	15.33 a	42.67 a	60.67 a	89.00 a	94.00 a	94.33 a
Tes enfermo	17.67 a	41.67 a	56.00 a	78.67 a	87.00 ab	94.67 a
DMS	16.87	36.49	45.81	47.89	45.39	42.64
CV	113.51	92.36	83.6	63.96	59.54	56.06

*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa

6.5.2.2 *Neopestalotiopsis*

En la primer evaluación con fecha del 9 de marzo, los datos no muestran diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos y el testigo enfermo, en la segunda evaluación N, Col BII y la mezcla Col BII + N, fueron los tratamientos con menor porcentaje de severidad con un 9.0, 13.33 y 19.33% respectivamente y chapingo y testigo comercial como los tratamientos con mayor porcentaje de severidad. En la evaluación con fecha del 6 de abril todos los tratamientos incrementaron sus porcentajes de severidad con respecto a la evaluación pasada, donde los tratamientos con menor porcentaje de severidad

fueron los mismos que en la evaluación pasada (N, Col BII y la mezcla Col BII + N), así como los tratamientos con mayor porcentaje de severidad (Chapingo y testigo comercial).

En la cuarta evaluación en todos los tratamientos los porcentajes de severidad se incrementaron considerablemente siendo Chapingo y testigo enfermo los tratamientos con mayor porcentaje de severidad 83.33 y 81% respectivamente, y la rizobacteria N con un porcentaje de severidad de 28.33%, fue la única estadísticamente diferente al testigo enfermo, seguido de los tratamientos Col BII y la mezcla Col BII + N con el 50.33 y 58% respectivamente, pero estos no fueron estadísticamente diferentes al testigo enfermo.

En la evaluación del 4 de mayo hubo incremento en los porcentajes de severidad, los tratamientos con menor y mayor porcentaje de severidad fueron los mismos que en las dos evaluaciones pasadas. En la última evaluación, la cepa chapingo y la mezcla Col BII + chapingo presentaron mayor porcentaje de severidad con 2.2 y 11.14% menos respectivamente que el testigo enfermo, mientras que el tratamiento de la cepa N, presentó el menor porcentaje con 37%, seguido de la rizobacteria Col BII con el 52.67% (Cuadro 14).

Cuadro 14. Comparación de medias del porcentaje de incidencia de la secadera en plantas de fresa variedad Albión causadas por el patógeno *Neopestalotiopsis* spp. en Jacona, Michoacán, 2016

Tratamiento	% de severidad											
	09-mar		23-mar		06-abr		20-abr		04-may		18-may	
N	3.67	a*	9.00	c	12.33	c	28.33	b	32.33	b	37.00	b
Col BII	8.00	a	19.33	abc	27.33	c	50.33	ab	52.33	ab	52.67	ab
chapingo	15.67	a	51.67	a	70.67	a	83.33	a	85.20	a	85.87	a
Col BII+ chapingo	19.27	a	38.67	abc	44.00	abc	70.33	ab	76.33	ab	76.53	ab
chapingo+N	11.67	a	32.67	abc	46.00	abc	59.33	ab	68.67	ab	71.00	ab
Col BII+N	4.00	a	13.33	bc	21.00	c	58.00	ab	59.87	ab	60.33	ab
Mezcla de 3	8.67	a	24.00	abc	36.33	abc	59.33	ab	63.33	ab	66.67	ab
Tes comercial	15.33	a	40.67	abc	53.33	abc	66.33	ab	72.2	ab	73.87	ab
Tes enfermo	21.67	a	48.00	ab	70.00	ab	81.00	a	85.87	a	87.67	a
DMS	19.34		35.92		43.3		48.58		44.96		43.49	
CV	55.49		58.85		67.69		84.69		101.08		139.87	

*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, $p = 0.05$), CV: coeficiente de variación, DMS: diferencia mínima significativa.

6.5.2.3 *Fusarium* + *Neopestalotiopsis*

En la primer evaluación de los tratamientos inoculados con rizobacterias contra la infección de *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. los resultados muestran que hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) con respecto al testigo enfermo, los tratamientos estadísticamente diferentes fueron: la mezcla de las

tres rizobacterias y la rizobacteria Col BII con 2.0 y 13.33% respectivamente, los demás tratamientos no fueron estadísticamente diferentes al testigo enfermo.

En la segunda evaluación con fecha de 23 de marzo hubo incrementos en los porcentajes de severidad en todos los tratamientos excepto en la mezcla de las tres rizobacterias, el cual fue el único tratamiento estadísticamente diferente al testigo enfermo y presentó el menor porcentaje de severidad con 7.67%, seguido de la mezcla Chapingo + N con el 30.67% y Col BII con 33.33%, mientras que la mezcla Col BII + chapingo y la cepa N, fueron los tratamientos con mayor severidad con el 57 y 45% respectivamente.

A partir de la tercera evaluación con fecha del 6 de abril, en todos los tratamientos hubo incremento en los porcentajes de severidad a lo largo del tiempo hasta la quinta evaluación, en donde los tratamientos con mayor porcentaje de severidad fueron la mezcla Col BII + chapingo con 80.33% y Col BII + N y la cepa Col BII con 76.67% y los tratamientos con menor porcentaje de severidad fueron la mezcla de las tres rizobacterias y la mezcla chapingo + N, con 34.33 y 46.33% de severidad respectivamente.

En la última evaluación los tratamientos Col BII +N, Col BII y la mezcla de las tres rizobacterias no tuvieron incremento en su porcentaje de severidad, mientras que el testigo comercial y la mezcla Col BII + chapingo fueron los tratamientos con mayor porcentaje de severidad con 88.13 y 80.67% respectivamente, y los mejores tratamientos al presentar el menor porcentaje de severidad fueron la

mezcla de las tres rizobacterias y la mezcla de chapingo + N, los cuales presentaron diferencia estadística (Cuadro 15).

Cuadro 15. Comparación de medias del porcentaje de severidad de la secadera en plantas de fresa variedad Albi3n causadas por los pat3genos *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. en Jacona, Michoac3n, 2016.

Tratamiento	% de severidad											
	09-mar		23-mar		06-abr		20-abr		04-may		18-may	
N	16.67	ab*	45.00	a	57.67	ab	77.33	abc	73.67	abc	80.00	ab
Col BII	13.33	b	33.33	ab	47.00	ab	70.67	abc	76.67	abc	76.67	abc
chapingo	17.33	ab	36.67	ab	50.33	ab	69.00	abc	72.53	abc	73.53	abc
Col												
BII+chapingo	19.33	ab	57.00	a	74.00	a	80.00	abc	80.33	ab	80.67	ab
chapingo+N	12.67	b	30.67	ab	40.33	ab	42.33	bc	46.33	bc	47.33	bc
Col BII+N	17.00	ab	43.00	a	56.70	ab	74.67	abc	76.67	abc	76.67	abc
Mezcla de 3	2.00	b	7.67	b	16.67	b	33.67	c	34.33	c	34.33	c
Tes comercial	16.00	ab	43.00	ab	61.33	ab	80.33	ab	84.2	ab	88.13	ab
Tes enfermo	31.67	a	63.00	a	84.00	a	93.33	a	96.33	a	97.00	a
DMS	17.37		35.57		45.17		46.61		44.77		43.3	
CV	94.13		77.24		72.23		58.55		54.5		51.64	

*medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tuckey, p = 0.05), CV: coeficiente de variaci3n, DMS: diferencia m3nima significativa

6.6 Eficacia de los tratamientos

En la 3ltima evaluaci3n de los tratamientos inoculados con rizobacterias contra la infecci3n de *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. los resultados muestran que el tratamiento m3s eficaz para el control de *F. oxysporum* fue la mezcla de

las cepas chapingo + N con un 51.4% seguido de la cepa N con un 47.9%, mientras que para *Neopestalotiopsis* spp. las cepas N y Col BII fueron las que presentaron mayor eficacia con 57.8 y 39.9% respectivamente, sin embargo para la mezcla de los dos hongos los tratamientos más eficaces fueron la mezcla de las tres cepas y la mezcla chapingo + N con 64.6 y 51.2 % de eficacia respectivamente (Cuadro 16).

Cuadro 16. Porcentaje de eficacia de las rizobacterias aplicadas en plantas de fresa variedad Albión infectadas por los patógenos *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. agentes causales de la secadera en Jacona, Michoacán, 2016

Tratamiento	% de Eficacia		
	<i>Fusarium</i>	<i>Neopestalotiopsis</i>	<i>Fusarium + Neopestalotiopsis</i>
N	47.9	57.8	17.5
Col BII	22.5	39.9	21.0
chapingo	18.3	2.1	24.2
Col BII+chapingo	25.7	12.7	16.8
chapingo+N	51.4	19.0	51.2
Col BII+N	40.3	31.2	21.0
Mezcla de 3	10.4	24.0	64.6
Tes comercial	0.4	15.7	9.1

7. DISCUSIÓN

En los tres muestreos se aislaron hongos de cuatro géneros: *Fusarium*, *Neopestalotiopsis*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*, lo cual coincide con Ceja-Torres *et al.* (2008), quienes mencionan que dichos géneros están asociados a la secadera de la fresa en el Valle de Zamora, Michoacán. A lo largo de los muestreos *Neopestalotiopsis* y *Rhizoctonia* disminuyeron su frecuencia de aislamiento, lo cual coincide con lo citado por Bodah (2017), quien menciona que al avanzar la edad fisiológica de las plantas disminuye la susceptibilidad al ataque de *Rhizoctonia*, debido a cambios en la susceptibilidad de la planta por efecto de la variedad o competencia entre organismos. La frecuencia de aislamiento de *Fusarium* incremento, coincidiendo con Ceja-Torres *et al.* (2008) quienes reportan un incremento en el porcentaje de frecuencia de la etapa de floración a fructificación, esto debido al estrés provocado por la producción de frutos y al incremento en la temperatura a lo largo de los muestreos. El porcentaje de aislamiento de *Phytophthora* se mantuvo constante al no presentarse las condiciones de suelos inundados necesarios para el desarrollo de la enfermedad (Koike, 2009). Ceja-Torres *et al.* (2008) mencionan que los sistemas de manejo del cultivo influyen en la abundancia de los organismos asociados con mayor frecuencia a la secadera. Ellos reportan que hay mayor cantidad de inóculo de *Fusarium* en sistemas con macrotúnel, acolchado y sistema de riego por goteo que en los sistemas tradicional. El acolchado modifica la humedad, ventilación del suelo y temperatura, por lo que su potencial inductivo o restrictivo al parasitismo debe estudiarse (Mbagwu, 1991). La temperatura puede determinar

la frecuencia de las especies y suprimir diferencialmente sus poblaciones (Michereff *et al.*, 2005).

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en las variedades Albion y San Andreas. En ambas variedades los tratamientos en donde se aplicaron los hongos por sí solos presentaron la mayor incidencia y severidad, esto posiblemente se debió a que al no haber otro microorganismo no hay competencia y por lo tanto el patógeno solo requiere las condiciones favorables para su ataque (Rodriguez, 2001). En los tratamientos formados por la mezcla de dos y tres hongos los porcentajes de incidencia y severidad fueron muy variables en ambas variedades, esto tal vez se debio a que al haber más de un microorganismo presente en la rizosfera, estos establecen interacciones complejas como competencia, mutualismo, comensalismo, parasitismo etc. (Rodriguez, 2001), durante estas interacciones es posible que se beneficien, dañen o no se afecten entre los microorganismos patógenos.

Los hongos que ocasionaron mayor daño en ambas variedades fueron *Fusarium* y *Neopestalotiopsis*. Acorde con el árbol filogenético la especie aislada de *Fusarium* corresponde a *oxysporum*, en el caso del género *Neopestalotiopsis* las secuencias del GenBank con mayor porcentaje de similitud (97%) corresponden a *Neopestalotiopsis nataliensis*, pero la morfología de los conidios no coincide con dicha especie, ya que el número de apéndices apicales y el color de las células de la especie aislada en esta investigación no concuerda con la morfología de la especie *nataliensis* reportada por Maharachchikumbura *et al.*,

(2014), y el árbol filogenético solo agrupo a la especie aislada en el género *Neopestalotiopsis*, por lo que para conocer la especie a la que pertenece este aislamiento se deben realizar otro tipo de análisis moleculares como la amplificación de la Región del Factor de Elongación 1 α (TEF) y el gen de la β -tubulina (TUB) (Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

En el caso de *F. oxysporum* ya ha sido reportado en todas las zonas productoras de fresa en México como uno de los principales problemas en la producción de este cultivo (Ceja-Torres *et al.* 2008), por su parte *Neopestalotiopsis* spp. no ha sido reportado atacando la raíz y/o corona de la fresa en México, sin embargo, *Neopestalotiopsis clavispora*, si ha sido reportada en España (Chamorro, *et al.*, 2016), *Neopestalotiopsis* spp. en Bélgica (Van Hemelrijck *et al.*, 2017), y Latvia (Grantina-Ievina y Kalniņa, 2016) ocasionando pudrición en corona y raíz. Por lo que esta investigación sería el primer reporte de *Neopestalotiopsis* sp. atacando raíz y corona en el cultivo de fresa en México.

De las variedades evaluadas en las pruebas de patogenicidad la más susceptible fue Albion, lo cual coincide con lo reportado con Santos *et al.* (2016) y Vela-Delgado *et al.*, (2016) quienes mencionan a esta variedad como susceptible al ataque de *Fusarium*. Estos mismos autores reportan a la variedad San Andreas como resistente a *Fusarium*, coincidiendo con lo encontrado en este experimento. Vela-Delgado *et al.* (2016) reportan que las plantas de fresa variedad San Andreas al ser inoculadas con *Fusarium* spp. emitieron mayor cantidad de raíz, la corona fue menos afectada y obtuvo un mayor peso fresco que la variedad

Albion. Aun cuando la variedad Albion es susceptible al ataque de *Fusarium* spp. es más utilizada en las zonas de producción de México, porque sus frutos poseen mejores características organolépticas que la variedad San Andreas.

La rizobacteria N mostró un gran potencial como antagonista de *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*, este resultado no coincidió con el experimento llevado a cabo bajo condiciones *in vivo*, donde la rizobacteria N aplicada individualmente no redujo el porcentaje de incidencia de la enfermedad. Esto posiblemente debido a que el control que ejerce sobre el hongo en condiciones *in vitro* se debe a la producción de diversos metabolitos (Validov *et al.*, 2005), lo cual no es garantía de que el metabolito pueda ser producido bajo condiciones naturales, ni que alcanzará los niveles necesarios para suprimir el daño ocasionado por el patógeno (Kloepper, 2012). En la variable severidad los mejores tratamientos fueron la mezcla de las rizobacterias chapingo + N con 46% y la rizobacteria N aplicada individualmente con el 49.33%. Esto posiblemente a que la mezcla de especies y/o cepas antagonistas permiten una colonización más extensa de la rizósfera y aumentan la expresión de las características importantes de biocontrol que afectan al patógeno en un rango más amplio de condiciones ambientales que aplicadas individualmente (Agustí *et al.*, 2011).

De acuerdo con los resultados obtenidos la cepa N tiene un gran potencial como agente de control biológico contra *F. oxysporum* al inhibir su crecimiento tanto *in vitro* como *in vivo*, y su efecto se incrementa al combinarla con la cepa chapingo. Siendo la mezcla de estas dos el mejor tratamiento para el control de *F.*

oxysporum. Ya que la combinación de microorganismos de diferentes modos de acción pueden ampliar el espectro de sus actividad y reducir la variabilidad en el entorno natural cambiante (Szczecz y Dysko, 2008)

De las rizobacterias aplicadas de forma individual para el control *in vivo* de *Neopestalotiopsis* spp. la cepa Col BII fue la que presentó menor porcentaje de incidencia (66.4%), y la mezcla Col BII + N con 73% de incidencia, sin presentar diferencia significativa con el testigo enfermo, estos resultados son contrarios a los resultados *in vitro* donde estas rizobacterias presentaron mayor inhibición del crecimiento micelial de *Neopestalotiopsis* spp. esto posiblemente a que la concentración de las rizobacterias y/o de los metabolitos producidos fue bajo para competir con los microorganismos patógenos y actuar bajo condiciones naturales (Szczecz y Dysko, 2008). En la variable severidad las cepas N y Col BII aplicadas individualmente para el control de *Neopestalotiopsis* spp. fueron los mejores tratamientos al presentar el 37 y 52.67% de severidad respectivamente, sin embargo su mezcla no resultó tan efectiva para esta variable como para la variable incidencia. No siempre las combinaciones de agentes de control biológico son efectivas ya que estas pueden ser interacciones antagónicas (Xu *et al.*, 2011) y esto se puede deber a que los agentes de control biológico solo tienen un mecanismo de acción y los hace competir entre ellos por ejemplo la producción de sideróforos (Bora *et al.*, 2004) o a la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento del agente de control biológico aplicado en la mezcla (Xu *et al.*, 2010).

Del experimento *in vivo* llevado a cabo bajo condiciones de invernadero para el control de ambos hongos, los tratamientos formados por la aplicación de rizobacterias por si solas no tuvieron diferencia estadística significativa con el testigo enfermo para las variables incidencia y severidad. Esto posiblemente a que el uso individual de antagonistas no ofrece un nivel de control de la enfermedad suficiente cuando la enfermedad es causada por diferentes cepas de un patógeno o un complejo de patógenos (Sangeetha *et al.*, 2010). Los mejores tratamientos en la variable incidencia y severidad fueron los tratamientos formados por las tres rizobacterias y la mezcla de chapingo + N, esto posiblemente a que la aplicación de dos o más agentes de control biológico con diferentes requerimientos ambientales y/o mecanismos de acción, puede facilitar el control de la enfermedad sin afectar la eficacia de los organismos bajo condiciones adversas (Guetsky *et al.*, 2002). Además Krauss *et al.* (2001) menciona que el uso de antagonistas en mezclas puede llegar a ser más eficaz, especialmente en el control de pudriciones de raíz y corona, ya que la composición del complejo de patógenos varía considerablemente y una sola cepa no puede actuar igual contra todos los patógenos pertenecientes al complejo.

8. CONCLUSIONES

1. En la secadera de la fresa en Jacona, Michoacán, en el ciclo de producción 2016, se encontraron asociados a ella, cuatro géneros *Fusarium*, *Neopestalotiopsis*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* y los que presentaron mayor virulencia fueron *Fusarium oxysporum* y *Neopestalotiopsis* sp. siendo este último hongo la primera vez que se reporta como agente causal de la secadera de la fresa en México.
2. En las pruebas de antagonismo *in vitro* las tres rizobacterias utilizadas; N, Col BII y chapingo presentaron inhibición en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. La rizobacteria N fue la que mostro mayor porcentaje de inhibición contra *F. oxysporum* con un 68.9% y contra *Neopestalotiopsis* spp. la rizobacteria chapingo fue la que inhibió más con un 49.8%.
3. En el experimento *in vivo* el tratamiento aplicado contra *F. oxysporum* que presentó mayor porcentaje de eficacia fue la mezcla de chapingo + N con un 51.4% de eficacia.
4. En el control *in vivo* de *Neopestalotiopsis* spp. el mejor tratamiento fue la rizobacteria N la cual obtuvo un 57.4% de eficacia.
5. El tratamiento con mayor eficacia para la mezcla de *F. oxysporum* y *Neopestalotiopsis* spp. fue la mezcla de las tres rizobacterias con un 64.4%.

9. BIBLIOGRAFIA

Abad Z., G., J. Abad A., M. Coffey D., P. Oudemans V., W. Man in 't Veld A., H. de Gruyter., J. Cunningham., and F. Louws J. 2008. "*Phytophthora bisheria* Sp. Nov., a New Species Identified in Isolates from the Rosaceous Raspberry, Rose and Strawberry in Three Continents". *Mycologia* 100 (1): 99–110.

Agustí L., A. Bonaterra, C. Moragrega, J. Camps, and E. Montesinos. 2011. "Biocontrol of Root Rot of Strawberry Caused by *Phytophthora cactorum* with a Combination of Two *Pseudomonas fluorescens* Strains." *Journal of Plant Pathology* 93 (2): 363–72.

Anandhakumar J., and W. Zeller. 2008. "Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115 (2): 49–56.

Asad-Uz-Zaman M., B. Mohammad R., I. K. Mohammad A., M. Khurshed B., and L. Mohammad A. 2015. "Integrated options for the management of black root rot of strawberry caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn". *Comptes Rendus Biologies* 338 (2): 112–20.

Berg G., S, Kurze, A. Buchner, E. M. Wellington, and K. Smalla. 2000. "Successful Strategy for the Selection of New Strawberry-Associated Rhizobacteria Antagonistic to *Verticillium Wilt*". *Canadian Journal of Microbiology; Ottawa* 46 (12): 1128–37.

Bodah ET. 2017. Root Rot Diseases in Plants: A Review of Common Causal Agents and Management Strategies. *Agricultural Research & Technology* 5(3): 1-8

Bora T., H. Ozaktan, E. Gore and E. Aslan. 2004. Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by Wettable Powder Formulations of the two Strains of *Pseudomonas putida* Journal Phytopathology 152: 471–475

Bucio V., C. M., F. R. Díaz, O. A. Martínez y J. J. Torres. 2016. Efecto del ozono sobre la población microbiana del suelo y el crecimiento de plantas de fresa. Latinoamericana 34: 229-237.

Castro F. J., y P. Dávalos. 1990. Etiología de la secadera o pudrición de la raíz y corona de la fresa en Irapuato, Gto. Revista Mexicana de Fitopatología. 8: 80-86.

Carbú M., V. E. González-Rodríguez, C. Garrido, A. M. Husaini, and J. M. Cantoral. 2016. “New Biocontrol Strategies for Strawberry Fungal Pathogens.” *In Strawberry: Growth, Development and Diseases*. Husaini A. M., and D. Neri. (ed). Wallingford, England, pp: 196–211.

Ceja-Torres L. F., G. Mora-Aguilera, D. Téliz, A. Mora-Aguilera, P. Sánchez-García, C. Muñoz-Ruíz, B. Tlapal-Bolaños, y R. De La Torre-Almaraz. 2008. “Ocurrencia de hongos y etiología de la secadera de la fresa con diferentes sistemas de manejo agronómico”. *Agrociencia* 42 (4): 451–61.

Chamorro M., A. Aguado, and B. De los Santos. 2016. “First Report of Root and Crown Rot Caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on Strawberry in Spain”. *Plant Disease* 100 (7): 1495–1495.

Costa R., C. M. Gomes, E. Krögerrecklenfort, K. Opelt, G. Berg, and K. Smalla. 2007. “*Pseudomonas* Community Structure and Antagonistic Potential in the Rhizosphere: Insights Gained by Combining Phylogenetic and Functional Gene-Based Analyses”. *Environmental Microbiology* 9 (9): 2260–73.

Eilenberg J., A. Hajek, and C. Lomer. 2001. "Suggestions for Unifying the Terminology in Biological Control". *BioControl* 46 (4): 387–400.

Erwin D. C., and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp: 96-124.

Esitken A., H. E. Yildiz, S. Ercisli, M. F. Donmez, M. Turan, and A. Gunes. 2010. "Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry". *Scientia Horticulturae* 124 (1): 62–66.

FAOSTAT. 2017. Índices Nacionales de producción de fresa. (Consultado el 01/04/2017) Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Fravel D., C. Olivain, and C. Alabouvette. 2003. "*Fusarium oxysporum* and Its Biocontrol". *New Phytologist* 157 (3): 493–502.

Garrido, C., V. E. González-Rodríguez, M. Carbú, A. M. Husaini, and J. M. Cantoral. 2016. "Fungal Diseases of Strawberry and Their Diagnosis." *In Strawberry: Growth, Development and Diseases*. Husaini A. M., and D. Neri. (ed). Wallingford, England, pp: 157–95.

Garrido C., F. J. Fernández-Acero, M. Carbú, V. E. González-Rodríguez, E. Liñeiro, and J. M. Cantoral. 2012. "Molecular Microbiology Applied to the Study of Phytopathogenic Fungi". *In Gel Electrophoresis - Advanced Techniques*. Magdeldin S. (ed). In Tech, pp: 139-156.

Garrido C., M. Carbú, F.J. Fernández-Acero, V.E. González-Rodríguez, and J.M. Cantoral. 2011. New insight in the study of strawberry fungal pathogens. In:

Husaini, A.M. and J.A. Mercado, (eds) *Genomics, Transgenics, Molecular Breeding and Biotechnology of Strawberry*. Global Science Books, Japan/UK, pp. 24–39.

Gordon T. R., and K. V. Subbarao. 2007. Marchitez causada por el *Verticillium* de la fresa. Strawberry Annual Production Research Report, 2007-01.

Grantina-levina L., I. Kalniņa. 2016. Strawberry crown rot – a common problem in 2015. *Environmental and Experimental Biology* 14: 51–52

Guerrero-Molina M. F., B. Winik C., and R. Pedraza O. 2012. “More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*”. *Applied Soil Ecology*, 61: 205–12.

Guetsky R, D. Shtienberg, Y. Elad, E. Fischer, and A. Dinoor. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92:976-985.

Heeb S., and D. Haas. 2001. “Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria”. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (12): 1351–63.

Hernández-Rodríguez A., M. Heydrich-Pérez, M. G. Velázquez-del Valle, y A. N. Hernández-Lauzardo. 2006. “Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica”. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (1): 42-49.

Iribarren M. J., B. A. González, y S. Filippini. 2017. “Distribución de *Phytophthora cactorum* en el perfil de un suelo cultivado con frutilla (*Fragaria x ananassa*).” *Summa Phytopathologica*, 38 (1):17-23.

Kloepper J. W. 2012. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. In: Enfermedades de plantas: Control Biológico. Hoyos L. (ed.). Bogota, Colombia. Pp: 97-126

Koike S. T., S. C. Kirkpatrick, and R. T. Gordon, 2009. Fusarium wilt of Strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in California. Plant Disease 93:1077

Koike S. T., R. T. Gordon, O. Daugovish, and H. Ajwa. 2013. Marchites por Fusarium de la fresa. California Strawberry Commission Annual Production Research Report 11: 1-4.

Krauss U, P. Mathews, R. Bidwell, M. Hocart, and F. Anthony. 2001. Strain discrimination of fungal antagonists of *Colletotrichum musae*: Implications for biocontrol of crown rot of banana. Mycology Research 105:67–76

Kurze S., H. Bahl, R. Dahl, and G Berg. 2001. “Biological Control of Fungal Strawberry Diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48”. *Plant Disease* 85 (5): 529–34.

Maas, J. L. 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*. 2nd edn. American Phytopathological Society, St Paul Minnesota.

Maas J. L. 2004. “Strawberry Disease Management”. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*. Naqvi, S.A.M.H. (ed.). Springer, Dordrecht. pp: 441–83.

Maharachchikumbura S.S.N, K.D. Hyde, J.Z. Groenewald, J. Xu, and P.W. Crous. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. STUDIES IN MYCOLOGY 79: 121–186

Martin F. N., and C. T. Bull. 2002. "Biological Approaches for Control of Root Pathogens of Strawberry". *Phytopathology* 92 (12): 1356–62.

Mbagwu, J. S. C. 1991. Influence of different mulch materials on soil temperature, soil water content and yield of three Cassava cultivars. *Journal. Sci. Food Agriculture*. 4:569-577.

Michereff, S. J., L. A. M. Peruch, e D. E. G. T. Andrade. 2005. Manejo integrado de doenças radiculares. In: *Ecología e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Michereff, S. J., D. E. G. T. Andrade, e M. Menezes (eds). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brasil. pp: 367-388.

Nam M., M. S. Park, H. Kim, and S. Yoo. 2009. "Biological Control of Strawberry *Fusarium* Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 Formulation". *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (5): 520–24.

Pastrana A. M., M. J. Basallote-Ureba, A. Aguado, K. Akdi, and N. Capote. 2016. "Biological Control of Strawberry Soil-Borne Pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, Using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp." *Phytopathologia Mediterranea; Florence* 55 (1): 109–20.

Pedraza O., R., J. Motok, S. M. Salazar, A. L. Ragout, M. Mentel, M. Tortora, M. Guerrero-Molina, B. Winik, and J. C. Díaz-Ricci. 2010. "Growth-Promotion of Strawberry Plants Inoculated with *Azospirillum brasilense*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (2): 265–72.

Rafai M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1–56.

Rodríguez G. M. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana* 1: 53-78

SAGARPA, 2015, Panorama de la fresa. Boletín informativo. Michoacán, México, 2pp

Santos B., M. Chamorro, J. J. Medina-Mínguez, N. Capote, A. Aguado, y F. Romero. 2016. "Emerging Diseases in Strawberry Crop: Charcoal Rot and Fusarium Wilt." *In Strawberry: Growth, Development and Diseases*. Husaini A. M., and D. Neri. (ed). Wallingford, England, pp: 212–50.

Sangeetha G., R. Thangavelu, S. Usha Rani, A. Muthukumar, and R. Udayakumar. 2010. Induction of systemic resistance by mixtures of antagonist bacteria for the management of crown rot complex on banana. *Acta Physiol Plant* 32:1177–1187

Shaw D. V., and K. D. Larson. 2006. Strawberry plant named "Albion". USPP16228 P3. The Regents of The University of California, Oakland, CA.

Shaw D. V., and K. D. Larson. 2008. Strawberry plant named "San Andreas". USPP19975 P2. The Regents of The University of California, Oakland, CA.

Sneh B., L. Burpee, and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp: 39-42.

Shen T., C. Wang, H. Yang, Z. Deng, S. Wang, B. Shen, and Q. Shen. 2016. "Identification, solid-state fermentation and biocontrol effects of *Streptomyces hygroscopicus* B04 on strawberry root rot". *Applied Soil Ecology* 103: 36–43.

Sutton, J. 1994. Biological control of strawberry diseases. *Advances in Strawberry Research* 13: 1–12.

Szczecz M., and J. Dysko. 2008. The possibility to use selected mixtures of PGPR bacteria in tomato cultivation. *Vegetable Crops Research Bulletin* 68: 47-56

Tortora M. L., J. Díaz-Ricci, and R. Pedraza. 2012. "Protection of Strawberry Plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against Anthracnose Disease Induced by *Azospirillum brasilense*". *Plant and Soil* 356 (1–2): 279–90.

Validov S., O. Mavrodi, L. De La Fuente, A. Boronin, D. Weller, L. Thomashow, and D. Mavrodi. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Letters* 242: 249-256.

Van H., W., A. Ceustermans, J. V. Campenhout, P. Lieten, and D. Bylemans. 2017. "Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*". *Acta Horticulturae*, 1156: 781–86.

Van Hemelrijck W., A. Ceustermans, J. Van Campenhout, P. Lieten, and D. Bylemans. 2017. Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. *Acta Horticulturae* 1156: 781-786.

Vela-Delgado M. Dolores, N. Capote, J. M. Melero-Vara, y M. J. Basallote-Ureba. 2016. "Evaluación de la susceptibilidad de variedades comerciales de fresa a *Fusarium solani*", septiembre.

White T. J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR Protocols: Is: a guide to methods and applications. M.A. Innis, D.H. Gelfad, J.J. Sninsky, T.J. White. (eds). Academic Press, New York. pp: 315-322.

Wing K. B., M. Pritts, and W. Wilcox. 1995. "Biotic, Edaphic, and Cultural Factors Associated with Strawberry Black Root Rot in New York". *HortScience* 30 (1): 86–90.

Xu X., J. Robinson, M. Jeger and P. Jeffries. 2010. Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. *Biocontrol Science and Technology*. 20(4):359 — 373