



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Neopestalotiopsis* spp. Y EFECTO DE FUNGICIDAS EN PRE Y POST-INFECCIÓN EN EL CULTIVO DE FRESA

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Protección Vegetal

PRESENTA

URIEL ACOSTA GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de: **ÁNGEL REBOLLAR ALVITER, PhD.**



APROBADA



Chapingo, Edo. México, Texcoco, mayo de 2022

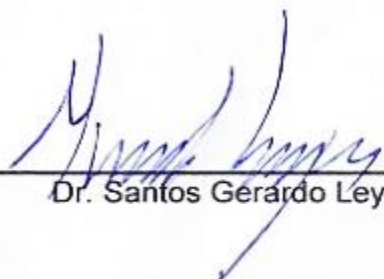
La presente tesis, titulada: **CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Neopestalotiopsis* spp. Y EFECTO DE FUNGICIDAS EN PRE Y POST-INFECCIÓN EN EL CULTIVO DE FRESA**, realizada por el alumno **Uriel Acosta González** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL



Director:

Dr. Ángel Rebollar Alviter



Asesor

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir



Asesora:

Dra. Hilda Victoria Silva Rojas

Chapingo, Edo. de México, Texcoco; Mayo de 2022

DEDICATORIA

A mi familia **Gaspar Acosta Corona, Ma. Guadalupe González Silva y Diego Armando Acosta González**, quienes me han inculcado valores y han sido pieza fundamental en mi formación académica, ya que han realizado sacrificios para poder apoyarme en todo momento, gracias por no bajar los brazos para que yo tampoco lo hiciera, gracias por motivarme siempre, aun cuando la situación parecía adversa, hoy cumpla una meta más en vida, gracias por el apoyo incondicional, que siempre me han brindado.

A todos mis compañeros en distintas etapas de mi vida muy en especial a mis compañeros del posgrado en Protección Vegetal, ya que me siento muy contento de haber coincidido con personas de diferentes estados del país ``**Aguascalientes, Estado de México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Campeche**``. GRUPO MUY UNIDO.

A mis amigos de toda la vida, quienes siempre han estado pendiente de mí, sin importar la distancia, lugar hora y fecha, gracias por siempre motivarme a seguir adelante.

A todas las personas que he conocido en este andar, ya que de manera directa e indirecta contribuyeron en mi formación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por otorgarme una beca para poder realizar mis estudios de Maestría.

Este trabajo tiene el propósito de contribuir a los **PRONACES**, principalmente a la soberanía alimentaria y a la conservación del medio ambiente.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y a los profesores del posgrado de **Protección Vegetal** por brindarme herramientas necesarias, además, de compartir su conocimiento y experiencias, que de manera directa hoy se ve reflejado en la culminación académica de este posgrado.

Al **Centro Regional Universitario Centro Occidente, Morelia** (CRUCO), por brindarme la oportunidad de realizar mis trabajos experimentales para poder lograr el objetivo de esta investigación.

Al **Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida** (GCREC – UF). Por contribuir en el desarrollo de esta investigación.

Al **Ph. D Ángel Rebollar Alviter**, agradezco por el constante apoyo brindado impulsándome a siempre continuar con mi formación profesional, convirtiéndose en mentor para mí, además, de compartir experiencias y consejos, así como, por el asesoramiento y dirección de esta investigación.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir**, por el aporte brindado para culminar con esta investigación y por compartir su conocimiento.

A la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, por siempre motivarme a continuar con mi formación profesional, por la enseñanza y conocimiento brindado, además, de su constatare disposición.

Agradezco también a **Sarahi**, por apoyarme en todos los ámbitos, de cada momento en esta etapa, siendo gran compañera y amiga. Agradezco a **Guadalupe, Gabriela, Adriana y Ana Maria**, así como a **Daniel** quienes me apoyaron, en el desarrollo de los trabajos experimentales. Así mismo, al personal del Centro Regional Morelia (CRUCO).

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Uriel Acosta González

Fecha de nacimiento: 9 de septiembre 1993

Lugar de nacimiento: Morelia Michoacán

Curp: AOGU930909HMNCNR05

Profesión: Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Cedula Profesional: 11035116



FORMACIÓN ACADÉMICA PROFESIONAL

Comenzó sus estudios profesionales del 2011 al 2015 en el Instituto Tecnológico del Valle de Morelia (Tecnológico Nacional de México), se graduó en 2016, como ingeniero agrónomo con el título **“Efecto de fungicidas químicos, biológicos y activadores de resistencia en la marchitez de la zarzamora (*Rubus* sp.) causada por *Fusarium oxysporum*”** realizada en el Centro Regional Universitario Centro Occidente Morelia, de la cual se publicó un artículo en la revista *Plant Disease* titulado **“Comparative performance of fungicides and biocontrol products in the management of *Fusarium* wilt of blackberry”** Fungió como asistente de investigación fitosanitaria de 2017 a 2020 en la línea de berries, en el Centro Regional Universitario Centro Occidente Morelia. En 2020 ingreso a la Maestría en ciencia en protección vegetal para darle continuidad a su formación académica.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	xv
JUSTIFICACIÓN.....	xviii
OBJETIVOS.....	xix
Objetivo general	xix
Objetivos específicos	xix
HIPÓTESIS	xix

CAPÍTULO I. *Pestalotiopsis* Y *Neopestalotiopsis* EN CULTIVOS AGRÍCOLAS

1.1. Revisión de literatura.....	1
1.1.1 Antecedentes	1
1.1.2. Clasificación taxonómica	4
1.1.3. Biología de hongos similares a <i>Pestalotiopsis</i> (<i>Pestalotiopsis</i> -like).....	4
1.1.4. Rol ecológico y ambiental.....	5
1.1.4.1. Como saprófito	5
1.1.4.2. Como endófito	6
1.1.4.3. <i>Pestalotiopsis</i> como degradador de polímeros.....	7
1.1.5. <i>Pestalotiopsis</i> como patógeno en cultivos.....	8
1.1.5.1. Hospedantes	14
1.2. Ciclo de vida y epidemiología.....	15
1.3. Diseminación.....	17
1.4. Manejo de la enfermedad causada por <i>Neopestalotiopsis</i> spp.	18
1.4.1. Prácticas culturales	18
1.4.2. Tácticas biológicas	18
1.4.3. Tácticas químicas.....	19
1.5. Literatura citada.....	21

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS DE *Neopestalotiopsis* spp. EN EL CULTIVO DE FRESA

Resumen	33
2.1. Introducción	34
2.2. Materiales y métodos	37
2.2.1. Recolección y aislamiento de muestras	37
2.2.2. Obtención de aislamientos monoconidiales	40
2.2.3. Pruebas de patogenicidad.....	41
2.2.4. Caracterización morfológica y cultural de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	42
2.2.5. Identificación de aislamientos mediante High Resolution Melting	43
2.2.6. Análisis de datos	44

2.3. Resultados	46
2.3.1. Variabilidad patogénica y análisis de componentes principales	46
2.3.2. Respuesta de 11 variedades a la inoculación de <i>N. rosae</i>	50
2.3.3. Caracterización morfológica de los aislamientos	52
2.3.4. Caracterización morfológica conidial	58
2.3.5. Identificación molecular de aislamientos mediante HRM	59
2.4. Discusión	61
2.5. Conclusiones	65
2.6. Literatura citada	66

CAPÍTULO III. EFECTO DIFERENCIAL DE TRATAMIENTOS PRE Y POST-TRANSPLANTE PARA EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ Y CORONA DE LA FRESA CAUSADA POR *Neopestalotiopsis rosae*

Resumen	70
3.1. Introducción	71
3.2. Materiales y métodos	74
3.2.1. Incremento de inóculo	74
3.2.2. Material vegetal y establecimiento del experimento	75
3.2.3. Tratamientos y diseño experimental	75
3.2.4. Variables evaluadas	77
3.2.5. Análisis estadístico	79
3.3. Resultados	81
3.3.1. Efecto de tratamientos al trasplante en pre-infección	81
3.3.2. Efecto de tratamientos al trasplante en post-infección	91
3.4. Discusión	100
3.5. Conclusiones	108
3.6. Literatura citada	109

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1. Hospedantes de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. reportadas atacando el cultivo de fresa	14
---	----

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Aislamientos obtenidos de plantas de fresa utilizados para la identificación morfológica y molecular de <i>Neopestalotiopsis</i> spp	38
---	----

CAPÍTULO III

Cuadro 1. Productos empleados en los experimentos pre y post-infección en el manejo de la pudrición de corona causada por <i>Neopestalotiopsis rosae</i> en plantas de fresa en época de transplante	76
Cuadro 2. Efecto de tratamientos pre-transplante en la incidencia, severidad y mortalidad final de plantas de fresa en aplicación pre-infección	86
Cuadro 3. Peso fresco, peso seco y longitud de raíz de plantas de fresa con los tratamientos aplicados pre-transplante y pre-infección	90
Cuadro 4. Efecto de los tratamientos post-transplante en la incidencia, severidad y mortalidad final de plantas de fresa en aplicación post-infección	95
Cuadro 5. Peso fresco, peso seco, y longitud de raíz en los tratamientos aplicados post-transplante y post-infección de plantas de fresa	99

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Pestalotiopsis</i> spp.....	17
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1. Síntomas en diferentes partes de la planta de fresa. A) Marchitamiento de la planta con inicio de la parte externa hacia la parte interna del follaje; B) Coloración rojiza de follaje y nervaduras verdes; C) Manchas foliares; D) Pecíolo necrosado; E) Raíz necrótica; F) Parte interna de la corona con coloración marrón aperlado	40
---	----

Figura 2. Morfología de la colonia. A y B) Vista frontal de la colonia; C y D) Vista del reverso de la colonia.....	42
--	----

Figura 3. Morfología conidial. AA: Apéndices apicales; LC: Largo del conidio; AC: Ancho del conidio; AB: Apéndice basal.....	43
---	----

Figura 4. Distribución de las variables. Lamina foliar afectada (Lf) Diámetro del crecimiento final (Tc=Dc), diámetro de la mancha final (Pdmf), periodo de incubación (Sin=Pi) en la fresa variedad Fortuna	47
---	----

Figura 5. Análisis de componentes principales A) Mapa factorial de aislamientos; B) Mapa de correlación de variables. Sin=Pi= Periodo de incubación; Lf= lamina foliar dañada representada en días; Tc=Dc= crecimiento del aislamiento al día 8; Pdmf= Diámetro de la mancha final.....	48
--	----

Figura 6. Análisis por conglomerados de aislamientos de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. en base a Periodo de incubación (Sin=Pi), velocidad del crecimiento (Tc=Dc), Lamina foliar dañada (Lf) y diámetro final de la mancha (Pdmf)	50
---	----

Figura 7. Susceptibilidad de variedades de fresa a <i>N. rosae</i> . A) Severidad; B) Periodo de incubación; C) Diámetro final de la macha; D) Daño total de la lámina foliar. ALB= Albion, CR= Camino Real, FES= Festival, FORT= Fortuna, FRON= Frontera, MARI= Marisol, PALM= Palmeritas, ROC= Rociera, SAN_A= San Andrea, SEN= Sensation, SHYR= Shyra	52
---	----

Figura 8. Grupo morfológico 1. Aislamiento 13 de 11 días de crecimiento A) vista frontal; B) Reverso de la colonia	53
Figura 9. Grupo morfológico 2. Aislamiento 4 de 12 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia.....	53
Figura 10. Grupo morfológico 3. Aislamiento 8 de 9 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia.....	54
Figura 11. Grupo morfológico 4. Aislamiento 25 de 10 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 27 de 10 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 21 de 9 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 9 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia; Aislamiento 3 de 9 días de crecimiento I) vista frontal; J) reverso de la colonia; Aislamiento 18 de 8 días de crecimiento K) vista frontal; L) reverso de la colonia	54
Figura 12. Grupo morfológico 5. Aislamiento 1 de 8 días de crecimiento A) vista frontal B) reverso de la colonia; Aislamiento 6 de 10 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 28 de 11 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 5 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia.....	55
Figura 13. Grupo morfológico 6. Aislamiento 7, de 9 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 12 de 9 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 14 de 9 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 20 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia; Aislamiento 19 de 11 días de crecimiento I) vista frontal; J) reverso de la colonia; Aislamiento 2 de 10 días de crecimiento K) vista frontal; L) reverso de la colonia	56
Figura 14. Grupo morfológico 7. Aislamiento 16, de 11 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 24, de 9 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 29, de 10 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 26, de 11 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia; Aislamiento 23, de 9 días de crecimiento I) vista	

frontal; J) reverso de la colonia; Aislamiento 22 de 8 días de crecimiento K) vista frontal; L) reverso de la colonia.	57
Figura 15. Grupo morfológico 8. Aislamiento 15 de 11 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 17 de 9 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 11 de 9 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 10 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia.....	58
Figura 16. Curvas de fusión producidas mediante la prueba HRM. A) Neo_Tub2_A1F/Neo_Tub2_A1R; B) Neo_Tub2.B1F/Neo_Tub2_B1R	59
Figura 17. Conidios de <i>Neopestalotiopsis</i> spp. A-D) Conidios de <i>N. rosae</i> ; E-H) <i>Neopestalotiopsis</i> sp	60

CAPÍTULO III

Figura 1. Escala ordinal de severidad con categorías definidas de acuerdo con el desarrollo de los síntomas en plantas de fresa de la variedad Camino Real inoculadas con <i>Neopestalotiopsis rosae</i>	78
Figura 2. Efecto de tratamientos pre-transplante, pre-infección, 1= procloraz, 2= procloraz + thiram, 3= cyprodinil + fludioxonil, 4= difenoconazol + azoxystrobin, 5= iprodiona, 6= captan. 7= thiram, 8= pydiflumetofeno + fludioxonil, 9= fluxapyroxad + pyraclostrobin, 10= <i>T. koningiopsis</i> , 11= <i>T. asperellum</i> , 12= <i>Streptomyces</i> spp. 13= <i>B. amyloliquefaciens</i> , 14= Testigo sin inocular, 15= Testigo inoculado, 16= hymexazol. Panel A) Incidencia de la enfermedad a través del tiempo; B) ABCPE de la incidencia; C) Severidad de la enfermedad a través del tiempo; D) ABCPE de la severidad; E) Mortalidad de la enfermedad a través del tiempo; F) ABCPE de la mortalidad	85
Figura 3. Efecto de tratamientos químicos y biológicos pre-infección en plantas de fresa inoculadas con <i>Neopestalotiopsis rosae</i> en condiciones de invernadero a los 42 DDI.....	87
Figura 4. Efecto de tratamientos post-transplante post-infección, 1= procloraz, 2= procloraz + thiram, 3= cyprodinil + fludioxonil, 4= difenoconazol + azoxystrobin, 5= iprodiona, 6= captan, 7= thiram, 8= pydiflumetofeno + fludioxonil, 9= fluxapyroxad	

+ pyraclostrobin, 10= *T. koningiopsis*, 11= *T. asperellum*, 12= *Streptomyces* spp.
 13= *B. amyloliquefaciens*, 14= Testigo sin inocular, 15= Testigo inoculado, 16=
 hymexazol. Panel A) Incidencia de la enfermedad a través del tiempo; B) ABCPE
 de la incidencia; C) Severidad de la enfermedad a través del tiempo; D) ABCPE
 de la severidad; E) Mortalidad de la enfermedad a través del tiempo; F) ABCPE
 de la mortalidad 94

Figura 5. Efecto de tratamientos químicos y biológicos post-infección en plantas
 de fresa inoculadas con *Neopestalotiopsis rosae* en condiciones de invernadero a
 los 43 DDI 96

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Neopestalotiopsis* spp. Y EFECTO DE FUNGICIDAS PRE Y POST-INFECCIÓN EN EL CULTIVO DE FRESA

RESUMEN

La pudrición de raíz, corona y manchas foliares de la fresa ocasionada por *Neopestalotiopsis* spp. es una enfermedad emergente en México y diferentes partes del mundo que puede ocasionar pérdidas superiores al 70% de la producción. Los objetivos de esta investigación fueron; a) Realizar la identificación morfológica y molecular de aislamientos obtenidos de diferentes órganos de plantas de fresa y su variabilidad patogénica; y b) Evaluar el efecto de fungicidas biológicos y químicos en pre y post-infección para el control de la pudrición de corona causada por *N. rosae*. La identificación de 160 aislamientos se realizó mediante la técnica High-Resolution Melting (HRM). Una muestra de 29 aislamientos se usó para realizar la caracterización morfológica y determinar la patogenicidad en la variedad fortuna. Así mismo, se evaluó la susceptibilidad de 11 variedades de fresa a uno de los aislamientos mediante inoculación directa de hojas desprendidas. Los resultados indicaron que 159 aislamientos analizados correspondieron a *N. rosae* y uno como *Neopestalotiopsis* sp. De los 29 aislamientos caracterizados, se identificaron 8 grupos, con base al color de la colonia, textura, producción de micelio, elevación, margen y producción de acérvulos, todos patogénicos en la variedad fortuna. La variedad Marisol fue la menos susceptible. Los resultados de la segunda parte del estudio indicaron que en pre-infección los fungicidas pydiflumetofeno + fludioxonil, cyprodinil + fludioxonil, y procloraz, presentaron la menor incidencia, severidad y mortalidad. El procloraz permitió mayor crecimiento radical de la planta, mayor peso seco y fresco en comparación con el resto de los tratamientos. En contraste, la eficacia de los tratamientos en pos-infección se redujo significativamente. El Hymexazol resultó en mayor longitud radical. Sin embargo, procloraz reflejó en mayor peso fresco y seco. Los tratamientos menos efectivos para ambos experimentos fueron el fluxapyroxad + pyraclostrobin y *Bacillus amyloliquefaciens*. Los resultados de este estudio contribuirán al diseño de estrategias de manejo de la enfermedad y reducir las pérdidas a los productores de fresa.

Palabras clave: Pudrición de corona, *Neopestalotiopsis* spp., fresa, control biológico.

CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF *Neopestalotiopsis* spp. AND EFFECT OF FUNGICIDES PRE AND POST-INFECTION ON STRAWBERRY CROP

ABSTRACT

Root, crown, and leaf spot rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. is an emerging disease in Mexico and different parts of the world that can cause losses of more than 70% of production. The objectives of this research were: a) To perform the morphological and molecular identification of isolates obtained from different organs of strawberry plants and their pathogenic variability and b) To evaluate the effect of biological and chemical fungicides in pre-and post-infection for the control of crown rot caused by *N. rosae*. The identification of 160 isolates was performed using the High-Resolution Melting (HRM) technique. A sample of 29 isolates was used for morphological characterization and determining pathogenicity in the Fortuna variety. The susceptibility of 11 strawberry varieties to one of the isolates was also evaluated by direct inoculation of detached leaves. Results indicated that 159 isolates analyzed corresponded to *N. rosae* and one as *Neopestalotiopsis* sp. Of the 29 isolates characterized, 8 groups were identified based on colony color, texture, mycelial production, elevation, margin, and acervuli production, all pathogenic on the Fortuna variety. The Marisol variety was the least susceptible. The second part of the study indicated that the fungicides pydiflumetophen + fludioxonil, cyprodinil + fludioxonil, and prochloraz had the pre-infection lowest incidence, severity, and mortality. Prochloraz allowed greater plant root growth and higher dry and fresh weight than the rest of the treatments. In contrast, the efficacy of the post-infection treatments was significantly reduced. Hymexazole resulted in greater root length. However, prochloraz resulted in higher fresh and dry weights. The least effective treatments for both experiments were fluxapyroxad + pyraclostrobin and *Bacillus amyloliquefaciens*. The results of this study will contribute to the design of disease management strategies and reduce losses to strawberry growers.

Keywords: Crown rot, *Neopestalotiopsis* spp. strawberry, biological control.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción de berries o frutillas (fresa, zarzamora, arándano y frambuesa) a nivel mundial es de gran importancia, debido a que son altamente demandantes de mano de obra, así como, una alta rentabilidad económica. En producción y superficie de estos cultivos, México ha tenido un importante crecimiento en los últimos años concentrándose el 95% en los estados de Michoacán, Jalisco, Baja California y Guanajuato.

Entre las berries que más se cultivan en el mundo se encuentra, el cultivo de fresa (*fragaria x ananassa*), la cual pertenece a la familia de las Rosáceas y al género *Fragaria* (USDA, 2022). Este fruto es uno de los más aceptados a nivel mundial ya que tiene diferentes usos como producto fresco en la industria alimenticia, debido a los nutrientes esenciales y fitoquímicos como antocianinas y elagitaninos considerados como compuestos antioxidantes (Giamperi et al. 2012). La fresa (*fragaria x ananassa*) es cultivada en casi todo el mundo, siendo China, Estados Unidos de América, España y México los principales productores a nivel mundial con una producción de 1,880,635.96 1,060,634.7 307,419.74 y 283,707.26 t respectivamente, seguidos de Turquía, Egipto, República de Corea, Japón, Polonia y Rusia (FAOSTAT, 2021).

En México, la fresa es un cultivo de alto valor ya que para el año 2020, se reportó una producción de 557,514.20 t y un valor de \$10,720,443.96. Siendo Michoacán, Baja California y Guanajuato los principales estados productores con 329,183.51, 105,403.41 y 97,498.57 t respectivamente. La superficie cultivada a nivel nacional es de 12,974.84 ha (SIAP, 2021). Así mismo, genera miles de empleos directos e indirectos en su comercialización y producción. Las enfermedades causadas por fitopatógenos están entre las principales limitantes de la producción, en especial las enfermedades con origen en el suelo; entre ellos se encuentran las causantes de pudriciones de raíz y corona, como es el caso de *Fusarium oxysporum* species complex, *F. solani* species complex, *Colletotrichum* spp. *Macrophomina phaseolina*, *Cylindrocarpon destructans* (Sung et al. 1985; Koike y Gordon, 2015; Baroncelli et

al. 2015; Bi et al. 2016; Baggio et al. 2019) y oomycetos como *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. (Stensvand et al. 1999; Marin et al. 2018; Ishiguro et al. 2014). Sin embargo, en los últimos cinco años en el mundo han emergido enfermedades asociadas a hongos del género *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* causando diferentes síntomas y daños que van desde manchas foliares y tizones hasta marchitez y secadera (Chamorro et al. 2016; Rebollar-Alviter et al. 2020; Baggio et al. 2020; Hidrobo et al. 2021). En México, esta enfermedad causada por *Neopestalotiopsis rosae* fue reportada por primera vez por Rebollar-Alviter et al. (2020) presentando pérdidas entre 40 a 50% superando los 1500 millones de pesos (Rebollar-Alviter, comunicación personal).

Reportes recientes a nivel mundial de *Neopestalotiopsis* spp. y en específico *N. rosae*, sugieren que esta especie asociada a daños en diferentes órganos de plantas de fresa está siendo motivo de preocupación en todas las partes donde se cultiva, causando pérdidas considerables cuando se presentan las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. Aunque *N. rosae* se ha considerado que es el agente causal de la pudrición de corona y tizón foliar, otros reportes a nivel global sugieren la presencia de otras especies, lo que requiere un análisis geográfico mayor para confirmar si en México es solo una especie la que predomina. Así mismo, es importante comprobar si existe variación en la patogenicidad de los aislamientos en las principales variedades, siendo de gran importancia, la búsqueda de alternativas de manejo integrado, a fin de ofrecer a los productores opciones para reducir las pérdidas económicas.

Al respecto, la caracterización morfológica y la identificación filogenética son aproximaciones complementarias fundamentales para la identificación de especies de fitopatógenos, como los asociados a este problema, incluyendo su origen y especificidad (Maharachchikumbura et al. 2014).

Dado el impacto económico de *Neopestalotiopsis* spp. en fresa, es necesario conocer la diversidad de especies que están asociadas a los daños en los diferentes órganos de las plantas y determinar si existe variabilidad patogénica en poblaciones colectadas de diferentes zonas productoras de fresa. Paralelamente, ante la falta

de conocimiento de las herramientas químicas, biológicas o bioracionales para el manejo de la enfermedad, se hace necesario encontrar alternativas que contribuyan a reducir las pérdidas entre los productores. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron a) Identificar las especies de *Neopestalotiopsis* spp. asociadas a diferentes órganos de las plantas de fresa y establecer su variabilidad patogénica y b) Determinar el efecto, pre-y post-infección de productos biológicos y químicos en la incidencia y severidad de la pudrición de corona causada por *N. rosae* en plantas de fresa.

JUSTIFICACIÓN

La existencia de poca información sobre especies de *Pestalotiopsis* causando daños en fresa y otras berries reportadas en algunos países y en México es aún confusa. Los recientes reportes en varios países, entre ellos, Estados Unidos (Baggio et al. 2021), Taiwan (Wu et al. 2020), China, (Sun et al. 2021; Shi et al. 2021), Uruguay, México, Ecuador (Machín et al. 2019; Rebollar-Alviter et al. 2020; Hidrobo et al. 2021; Intriago-Reyna et al. 2021), han desarrollado pruebas moleculares para la identificación siendo comunicaciones cortas o primeros reportes. Sin embargo, se cree que existen más especies de *Pestalotiopsis* asociadas a los daños que pueden afectar a dicho cultivo. Actualmente en México, no existe una publicación de alguna colección de cepas que describa las especies de *Pestalotiopsis* o *Neopestalotiopsis*, asociadas al cultivo de fresa. Por lo tanto, en este estudio se buscó conocer las especies de *Neopestalotiopsis* y especies similares, determinar su variabilidad patogenénica asociadas a diversos síntomas y daños, así como la evaluación de productos para su manejo en las regiones más importantes de México.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar morfológica e identificar molecularmente las especies de *Neopestalotiopsis* spp. asociadas a diversos síntomas y daños en fresa y evaluar el efecto de fungicidas químicos y biológicos para manejo en el cultivo de fresa.

Objetivos específicos:

- a) Identificar las especies de *Neopestalotiopsis* spp. asociadas a diferentes órganos de las plantas de fresa y determinar su variabilidad patogénica.
- b) Determinar el efecto, pre-y post-infección de productos biológicos y químicos en la incidencia y severidad de la pudrición de corona causada por *N. rosae* en plantas de fresa.

HIPÓTESIS

Existen diferentes especies de *Neopestalotiopsis* como agente causal de la enfermedad en el cultivo de fresa, algunas de ellas de gran importancia económica que requieren del diseño e implementación de estrategias de manejo integrado aplicadas desde el transplante

CAPÍTULO I.

***Pestalotiopsis* spp. Y *Neopestalotiopsis* spp. EN CULTIVOS AGRÍCOLAS**

1.1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1.1 Antecedentes

El género *Pestalotia* De Not. fue descrito por primera vez por De Notaris en 1839, basado en *Pestalotia pezizoides* De Not. aislado de hojas de *Vitis vinifera* en Italia (Maharachchikumbura et al. 2011). Sin embargo, más tarde Steyeart (1949), basado en características morfológicas (número de células, color y número de apéndices) dividió a *Pestalotia* en los géneros *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* y *Truncatella*, cada una con diferentes características. La división de *Pestalotia* con *Pestalotiopsis* y *Truncatella* la realizó basada en la distinción de cuerpos fructíferos que se mencionaban hasta ese momento entre las mismas especies de *Pestalotia* y en la agrupación de las especies con conidios de 3 y 4 septos (4 y 5 células), lo cual marcó la pauta para reagrupar las especies en los géneros *Pestalotiopsis* y *Truncatella*. En específico, el género *Pestalotia* estuvo conformado por cepas con conidios de 6 células, las cuatro células medias con una coloración marrón oliváceo, con las células terminales hialinas y apéndices simples o ramificados. Para el género *Pestalotiopsis* se consideraron conidios con 5 células y para el género *Truncatella* conidios de 4 células.

Posteriormente, Steyeart (1949) dividió aún más el género *Pestalotiopsis* en monosetulado, bisetulado, trisetulado y multisetulado con base en el número de apéndices apicales. Aunado a esta división se realizaron más divisiones considerando la coloración de los conidios, concoloros a los que presentan células medianas de igual pigmentación y versicoloros para los que presentan células medianas más oscuras, además de apéndices ramificados o no ramificados y conidios en forma fusoides o claviformes. Recientemente, en una revisión exhaustiva de este grupo, Maharachchikumbura et al. (2014), describieron la controversia de

autores como Moreau (1949), Servazzi (1953), Guba (1961) y Dube y Bilgrami (1965), con los reportes de Steyeart (1949), pues no apoyaban la clasificación propuesta, en la cual dividía a *Pestalotia* en 3 géneros diferentes, ya que Steyeart agrupó a especies con apéndices apicales del género *Monochaetia* en *Pestalotiopsis* monosetulado o en *Truncatella*.

Guba (1961) publicó en su monografía de *Mochaetia* y *Pestalotia* la división de los conidios en secciones siendo cudriloculadas para conidios con cuatro células, quinqueloculadas para conidios de cinco células y sexloculadas para conidios de seis células, además subdividió las secciones de los conidios, sobre la base y la forma conidial, el color y la posición de las sétulas o apéndices. Finalmente, consideró a *Monochaetia* como un género distinto, pero *Pestalotiopsis* y *Truncatella* como sinónimos de *Pestalotia*. Por su parte, Steyeart, siguió trabajando para demostrar con evidencias la división de *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* y *Truncatella* las cuales fueron divididas con base en caracteres bien definidos. Posteriormente surgieron nuevos reportes apoyando y respaldando la propuesta realizada por Steyeart, autores como Griffiths y Swart (1974) observaron mediante microscopía electrónica la relación entre *Pestalotia* y *Pestalotiopsis* apoyando la propuesta de Steyeart. Sutton (1980), se basó más en el proceso de formación de conidios propuesta en la investigación realizada por Griffiths y Swart aceptando los géneros propuestos por Steyeart. Por lo tanto, muchas de las especies de *Pestalotia* fueron reclasificadas dentro de estos géneros, en su mayoría al género *Pestalotiopsis* (Naj Raj et al. 1985).

Aunque en los años posteriores, se habló más de *Pestalotiopsis* que de *Truncatella* debido probablemente a la cantidad de especies agrupadas en este género. Los aislamientos de *Pestalotiopsis* se agruparon de acuerdo a similitudes en la morfología del conidio (Jeewon et al. 2003), lo cual determinó que se siga utilizando la clasificación propuesta por Steyeart por lo que, Hu et al. (2007), consideraron que los caracteres como el color de las células mediana (concoloros, versicoloros ocre olivaceo y versicoloro fuliginoso olivaceo), la longitud conidial y el ancho del conidio son estables dentro del género *Pestalotiopsis*, las variaciones que se presentaron

fueron en la longitud de los apéndices. Estos pueden desarrollarse de la parte superior, media o inferior o de diferentes partes de las células hialinas apicales.

Posteriormente trabajos filogenéticos revelaron que las cepas de *Pestalotiopsis* se agrupan en tres clados, los cuales corresponden a tres tipos de conidios, en primera instancia los conidios que presentan células medianas concoloras de color marrón pálido u oliváceas, conidios con células versicolas y conidios con células medianas concoloras de color oscuro (Maharachchikumbura et al. 2014). Anteriormente Steyeart y Guba habían agrupado las especies de conidios en dos grupos, versicoloros; sin embargo, al realizar un análisis de secuencia basados en la intensidad de color de los conidios no demuestra ser un carácter taxonómicamente confiable, por lo que Maharachchikumbura et al. (2014), proponen que en lugar de utilizar grupos versicoloros *Neopestalotiopsis* sea un nuevo género para el grupo versicolor.

Por lo que, basados en un análisis filogenético multilocus y en la morfología de especies similares a *Pestalotiopsis* dividieron a este complejo grupo en tres géneros *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. La clasificación en tres géneros estuvo bien sustentada y correlacionada con la morfología. El análisis filogenético se basó en la secuencia del gen 28S (nrRNA) además, de la utilización de la región del espacio transcrito interno (ITS) del rDNA y de las secuencias parciales de los genes correspondientes al factor de elongación de la traducción 1a (TEF) y β -tubulina (TUB) que aclararon los límites de las especies en los tres géneros. *Neopestalotiopsis* se puede distinguir fácilmente de *Pestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis* por las células medianas versicolores, y *Pseudopestalotiopsis* se distingue de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* por las secuencias de ADN y por tener las células medianas concoloras de color oscuro y conidióforos indistintos, puede presentar apéndices apicales nodosos o no nodosos (Maharachchikumbura et al. 2014; Hyde et al. 2019; Tennakoon et al. 2021; Li et al. 2021).

1.1.2 Clasificación taxonómica

Actualmente existen algunos reportes sobre especies de *Neopestalotiopsis* causando daños severos en el cultivo de fresa. Basado en los estudios realizados por Steyeart (1949) y posteriormente por Maharachchikumbura et al. (2014) *Pestalotiopsis* ha tenido reclasificaciones aceptándose actualmente a *Neopestalotiopsis* como una segregación de *Pestalotiopsis*, en la cual algunas especies de *Pestalotiopsis* fueron identificadas erróneamente incluyéndose en *Neopestalotiopsis* (Baggio et al. 2021). Por otro lado, de acuerdo con la base de datos de mycobank la clasificación taxonómica en la actualidad es de la siguiente manera:

Reino: *Fungi*

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Xylariomycetidae

Orden: Xylariales

Familia: Sporocadaceae

Género: *Neopestalotiopsis*

(NCBI, 2022)

1.1.3. Biología de hongos similares a *Pestalotiopsis* (*Pestalotiopsis*-like)

Las especies de *Pestalotiopsis* son cosmopolitas y se distribuyen en todo el mundo como saprófitos, endófitos o como hongos oportunistas de importancia económica en las plantas (Tennakoon et al. 2021). La fase sexual de *Pestalotiopsis* corresponde a *Pestalosphaeria* el cual fue descrito por Barr (1975) (Maharachchikumbura et al. 2011). *Pestalosphaeria concentrica* fue la especie tipo la cual se aisló de *Rhododendron maximum* en Estados Unidos en donde se forman las ascosporas y una vez germinadas dan origen a *Pestalotiopsis* en estado conidial

(asexual); sin embargo, es poco probable que el estado sexual y asexual se encuentren juntos en otras especies de plantas (Maharachchikumbura et al. 2014). En Estados Unidos se reportó que algunos aislamientos obtenidos de plantas nativas de *Rhododendron* se agruparon dentro de los géneros *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* (Baggio et al. 2020).

Por otro lado, *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* puede presentar dos etapas en su ciclo de vida, una como endófito y otra como patógeno (Tejesvi et al. 2009), aunque en la mayoría de las especies reportadas pueden ser patógenos, saprofitos o endófitos (Zhang et al. 2021).

1.1.4. Rol ecológico y ambiental

Las especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* se encuentran en ambiente tropicales, templados y extremos, tal es el caso de *Pestalotiopsis* aislado del intestino del saltamontes *Chondracris rosea* (Zhang et al. 2008; Das et al. 2021). Este género, también ha sido aislado del Río Sepik en Nueva Guinea el cual produce isopestacina que posee actividades antifúngicas y antioxidantes. Por lo tanto, se pueden encontrar como saprofitos, endófitos, o como patógenos de plantas que pueden causar una gran variedad de enfermedades como manchas foliares, muertes regresivas, tizones, pudriciones de corona, raíces y fruta en diversos cultivos lo cual reducen la producción y causan pérdidas económicas (CITA).

1.1.4.1. Como Saprófito

Varias especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* se han aislado de corteza, de hojas en descomposición, de suelo, agua contaminada, madera, tela, papel, lana, algunos ejemplos son *P. sydowiana*, *P. theae*, *P. guepinii*, *P. pamarum* y *P. funerea* (Maharachchikumbura et al. 2014; Tennakoon et al, 2021). Sin embargo, la mayor cantidad de especies saprófitas se encuentran en los bosques específicamente en hojas de los árboles de zonas tropicales (Costa y Gusmao, 2015). *Pestalotiopsis* sp. utiliza furaldehidos como fuente de carbono, que son compuestos volátiles que se forman durante la quema de biomasa, lo que puede explicar la presencia abundante de este patógeno en los bosques, aunado a la producción de enzimas como

celulosa, lipasa, pectinasa, pectato transeliminasa, que son capaces de descomponer la hojarasca (Prakash et al. 2015). Asimismo, *Pestalotiopsis* sp. actúa como degradador de lignina y celulosa de la hojarasca de *Pinus armandii* y por ende causa una pérdida de materia orgánica total debido a las enzimas endoglucanasa, xilanasa, lignina y peroxidasa (Zi et al. 2015), también se ha aislado como saprófito de hojas de eucalipto en descomposición por factores bióticos y abióticos (Crous et al. 2019).

1.1.4.2. Como Endófito

Se ha reportado que *Pestalotiopsis* puede encontrarse en más de 220 especies de plantas, de las cuales algunas de ellas son endófitos y producen algunos compuestos activos como el taxol, ácido torreyanico, pestalotiopsisinas, pestalosido, pestalofona C que brindan protección al hospedante contra patógenos; además, de su uso en medicina, en áreas agrícolas e industriales (Sánchez-Fernández et al. 2013; Maharachchikumbura et al. 2014; Vasić et al. 2017). Algunos ejemplos de compuestos que tienen usos benéficos son los obtenidos a partir de *P. microspora* como las nanopartículas de plata, que son citotóxicas contra células cancerígenas, así mismo, se ha obtenido el ácido torreyánico con efecto en células cancerígenas, otros metabolitos secretados por este endófito son el taxol y la bacatina. El taxol se utiliza para tratar el cáncer de mama, ovarios, pulmón y otras enfermedades en los tejidos de los humanos, al igual que la emodina 6-metil-1,3,8 trihidroxiantraquinona (Naik, 2020; Rana et al. 2020; Sieber, 2021; Ranjan et al. 2021; Nair et al. 2021). En el caso de *Pestalotiopsis* sp. aislado de manglares como endófito ha mostrado resistencia a algunos metales como el cobre, cromo, plomo y zinc (Hamzah et al. 2020), lo que implicaría una reducción de toxicidad para los manglares, ya que estos tienen una gran capacidad para retener metales pesados y un potencial biotecnológico y farmacológico (Cadamuro et al. 2021)

En la aplicación agrícolas, a partir de *Pestalotiopsis* sp. se obtienen compuestos como el ácido ambuico, pestacina e isopestacina con actividad antifúngica (Yang et al. 2012). Por otro lado, se han reportado metabolitos bioactivos, con actividad antifúngicas como: α -pirona que inhibe a *Gibberella zeae*, pestalofona C inhibe

Aspergillus fumigatus, isopestacina inhibe el crecimiento de *Pythium ultimum*, en el caso de *Cladosporium* sp. y *Rhizoctonia solani*, se ven afectados por pestalósido (Deshmukh et al. 2017). Otro compuesto bioactivo como lactonas monoterpénicas obtenidas de *P. foedan* presentan actividades antifúngicas contra *Botrytis cinerea* y *Phytophthora nicotianae*. *P. microspora* produce izobenzofuranona el cual presenta actividad antifúngica y antioxidante (Strobel et al. 2002). Existen más especies de este género que han sido aisladas como endófitos de diversos hospedantes, entre ellos se encuentran *P. foedan*, *P. adusta*, *P. photiniae*, *P. theae*, *P. fici*, *P. vacinii* (Maharachchikumbura et al. 2011; Deshmukh et al. 2017; Cadamuro et al. 2021).

El género *Neopestalotiopsis* también se ha aislado como endófito y como productor de giberelinas en *Stanhopea tigrina* orquídea endémica de México (Salazar-Cerezo et al. 2018). También se ha aislado a *N. hadrolaeliae* como endófito de raíces de *Hadrolaelia jongheana*, sin embargo, aún no se han determinado los metabolitos secretados por esta especie (Freitas et al. 2019). La obtención de eugenol, a partir de *Neopestalotiopsis* sp. aislado de *Cinnamomum loureiroi* fue reportada por Tanapichatsakul et al. (2019), el cual tiene propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

1.1.4.3. Pestalotiopsis como degradador de polímeros

La fabricación y el uso creciente de plásticos en la agricultura ha derivado en diversas controversias ecológicas y económicas, lo que ha motivado la búsqueda de alternativas enfocadas en la rápida degradación biológica, de diseños y la biorremediación para disminuir el efecto de los desechos plásticos basados en procesos biológicos (Brunner et al. 2018). Los microplásticos derivados de los acolchados, pueden afectar ambientes terrestres y acuáticos alterando el ecosistema y presentando un impacto negativo en la flora y fauna (Wong et al. 2020). Los plásticos biodegradables utilizados en la agricultura pueden alterar el desarrollo de plantas cultivadas y modificar el microbioma del suelo en pocos meses, por lo que, se busca realizar más estudios para tener una agricultura sostenible (Serrano-Ruiz et al. 2021). Varios organismos y microorganismos, entre los que sobresalen, bacterias como: *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., algunos

Streptomyces sp. y hongos como *Aspergillus* spp., *Mucor* sp., *Rhizpous* sp. y *Trichoderma viride* (Zhang et al. 2019; Elahi et al. 2021), han presentado efectos positivos para la degradación de poliuretano, ya que las enzimas de estos microorganismos rompen los enlaces monoméricos del polímero y esos monómeros libres les permiten seguir desarrollándose (Serrano-Ruiz et al. 2021). Otros materiales necesarios para la producción agrícola son el polietileno, polipropileno, copolímero etilenvinilacetato, policloruro de vinilo, policarbonato y polimetilmetacrilato (Mormile y Malinconico, 2017), que derivan en plásticos para invernaderos, túneles, microtúneles, acolchados, mallas antigranizo, anti-pájaros, cortavientos, malla sombra, empaques como sacos de fertilizantes, recipientes de agroquímicos, contenedores, cajas de empaque, tuberías de riego, depósitos de agua, hilos, macetas de vivero y películas plásticas para ensilaje (Tudor et al. 2019).

Además de los hongos mencionados anteriormente, el género *Pestalotiopsis* sobresale en la degradación de dichos materiales en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, los cuales utiliza como fuente de carbono. Por otro lado, con base en estudios realizados en condiciones *in vitro* con el hongo *P. microspora*, esta degradación se debe a la enzima serina hidrolasa y a las condiciones óptimas de temperatura 25 °C en las que se lleva a cabo la degradación (Russell et al. 2011; Liu et al. 2021). En esta especie, se identificó una enzima a la que se le denominó poliuretanasa. Una vez aislada esta enzima, por si sola es capaz de degradar el poliuretano sin la presencia del hongo (Russell et al. 2011). Otra enzima de este hongo que interviene en la degradación de poliuretano es la esterasa (Cregut et al. 2013), el aislamiento e incremento de estas enzimas tiene un gran potencial para acelerar la degradación de desechos plásticos en la agricultura, ante el incremento acelerado de la agricultura protegida en el mundo.

1.1.5. *Pestalotiopsis* como patógeno en cultivos

Los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* causan un gran número de enfermedades, normalmente las especies de estos géneros se nombran de acuerdo con el hospedante en el que se observó por primera vez, aunque no son específicos, sino que se pueden encontrar en una amplia gama de hospedantes e incluso

pueden causar problemas más graves como pérdidas económicas y reducción en la producción (Lee et al. 2006; Maharachchikumbura et al. 2014).

Pestalotiopsis y *Neopestalotiopsis* es un género patógeno de plantas que se ha reportado en una amplia gama de hospedantes causando manchas foliares, muertes regresivas, tizones, pudriciones de corona, raíces y fruta. Los frutales como el mango se han visto afectados por *P. magniferae* como el agente causal de la mancha gris de la hoja en el cultivo de mango (Mora et al. 2017). Además, diversas especies de *Neopestalotiopsis* causan manchas foliares como *N. clavispora* y *N. egyptica* reportada en Sinaloa, México (Gerardo-Lugo et al. 2020). Así mismo, *N. clavispora* causa manchas foliares en el cultivo de mango en el sur de China (Shu et al. 2020). Aunado a estos reportes se ha identificado y asociado especies de *Pestalotiopsis* como *P. adusta*, *P. asiatica*, *P. photinicola*, *P. saprophytica*, *P. trachicarpicola* causando daños severos en el mismo cultivo (Shu et al. 2020) y a *N. clavispora* como agente causal de manchas foliares en macadamia (Santos et al. 2019).

También se han aislado especies de *Neopestalotiopsis* de frutos enfermos de ocho árboles frutales, los cuales se inocularon en su hospedante y hospedantes alternos, comprobando la amplia gama de hospedantes en los que capaces de causar enfermedades, por otra parte, entre las especies que probaron ser no específicas, se encontraron seis aislamientos reportados como *Neopestalotiopsis* sp. (Darapanit et al. 2021).

El cultivo de guayaba es otro de los hospedantes de importancia de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis*; en este cultivo, estos hongos causan la enfermedad conocida como el clavo de la guayaba (Solarte et al. 2017). Al menos se han reportado cuatro especies de *Pestalotiopsis*: *P. clavispora*, *P. microspora*, *Pestalotiopsis* sp. y *P. disseminata* asociadas a daños en hojas y frutos de guayaba (Keith et al. 2006) y a *N. brasiliensis* asociado a daños en postcosecha en frutos de guayabo (Bezerra et al. 2018).

N. asiatica fue identificada por Ayoubi y Soleimani (2016) como agente causal de la mancha foliar en el almendro dulce (*Prunus dulcis*). El cocotero, es otro de los

cultivos que también es atacado por especies como *Nespestalotiopsis* sp., *N. javaensis* y *N. piceana*, esta última especie también se ha aislado de árboles de la familia pinácea (Maharachchikumbura et al. 2014). Otras especies que se han aislado de árboles forestales son *N. rosae*, *N. eucalypti*, *N. protearum* (Belisário et al. 2020; Santos et al. 2020), *N. mesopotamica*, *N. longianppendiculata*, *N. lusitanica*, *N. rhapsidis*, *N. rhododendri*, *N. steyaertii*, *N. eucalyptorum*, *N. eucaliptycola*. algunos como saprofitos y otros como patógenos causando necrosamiento de tallos (Maharachchikumbura et al. 2014; Diogo et al. 2021; Yang et al. 2021). También de árboles tropicales se han aislado especies como *N. pandanicola*, *N. phangngaensis*, *N. chiangmaiensis* (Tibpromma et al. 2018).

En banano, se ha reportado a *N. musae* como agente causal de manchas en hojas en Tailandia (Norphanphoun et al. 2019). Otra especie es *Camellia sinensis* en la que se ha reportado a *N. ellipsospora* como agente causal del tizón gris en china (Wang et al., 2019). *Camellia oleifera* se ve afectada por *N. protearum*, causando pudrición de semilla (Tang et al. 2021). Otras especies de *Neopestalotiopsis* como *N. camellia-oleifera*, *N. cubana*, *N. iberica* y *Neopestalotiopsis* sp. se han descrito también como patógenos de esta planta originaria de china y usada para extraer aceite (Li et al. 2021).

Por otro lado, en plantas ornamentales se ha aislado de lesiones en el tallo de *Rosa* sp. originaria de Nueva Zelanda a *N. rosae* y en el de *Paeonia suffruticosa* en Estados Unidos (Maharachchikumbura et al. 2014). En china se reportó a *N. rosicola* como el agente causal del cancro del tallo en *Rosa chinensis* (Jiang et al. 2018). Además, ornamentales como el *Anthurium andraeanum* son afectados por *N. clavispora* como agente causal de tizón en flores (Daengsuwan et al. 2021), y en China como agente causal de la mancha foliar en *Dendrobium officinale* (Cao et al. 2022).

Otros cultivos que en los últimos años están siendo severamente afectados por especies de los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* son algunas berries entre ellas zarzamora en menor medida, arándano, frambuesa y fresa, siendo este

último en el que se ha presentado grandes pérdidas económicas por los daños ocasionados, como marchitez, secadera, manchas foliares y tizones.

En el cultivo de zarzamora se ha reportado a *Pestalotiopsis* sp. como agente causal de canchros en el tallo (Ellis et al. 1984), en un documento extenso de la Universidad de Georgia publicado en abril del 2021, se menciona a *P. microspora* como uno de los agentes causales del tizón de caña. En frambuesa únicamente se ha reportado a *P. adusta* como agente causal de manchas foliares (Yan et al. 2019).

En China se ha reportado a *Pestalotiopsis* sp. y *P. photiniae* como el agente causal de la mancha de hoja en arándano (Luan et al. 2008; Chen et al. 2010). En Chile se ha descrito a *Pestalotiopsis* spp. como causante de canchros y muerte regresiva en ramas de arándano (Espinoza et al. 2008) y a *P. clavispora* como responsable de canchros, así como pudrición de raíz, tizón de ramas y muerte regresiva (González et al. 2012; Chen et al. 2016; Borrero et al. 2018; Xue et al. 2018). Especies como *P. australis*, *P. biciliata*, *P. chamaeropsis*, *N. rosae*, *N. scalabiensis*, *N. vaccinii* y *N. vacciniicola* se han reportado en Portugal como patógenos en plantas de arándano, indicando que, de estas especies, *N. rosae* fue la más agresiva en este cultivo, causando tizón de ramas y muerte regresiva (Santos et al. 2021). Por otra parte, en Perú se ha asociado a *N. rosae* con la muerte regresiva del arándano (Rodríguez et al. 2020). También se ha reportado a *N. chrysea* y *N. clavispora* como agente causal de muerte regresiva en arándano en China y Corea del Sur (Shi et al. 2016; Lee et al. 2019).

Con respecto al cultivo de fresa, los reportes de hongos similares a *Pestalotiopsis* han cambiado a lo largo de los años, en parte debido a la reclasificación del género y especies asociadas al cultivo. Una de las especies primeramente reportadas como patógenas en fresa fue *Pestalotia longisetula* por Howard y Albregts (1973). Sin embargo, más tarde fue renombrada como *Pestalotiopsis longisetula*, en la que la asociaban con la pudrición de la fruta (Camilli et al. 2002). Embaby (2007), reportó a *Pestalotia longisetula* (*Pestalotiopsis*) como agente causal de la pudrición de frutos de fresa en Egipto. De manera similar, en Marruecos reportaron a *Pestalotia longisetula* como el agente causal de mancha foliar y pudrición de fruto (Mouden et

al. 2014). En Brasil, se reportó el proceso de infección de *Pestalotiopsis longisetula* sobre hojas de fresa (Rodrigues et al. 2014) y a *Pestalotiopsis* spp. como causante de la pudrición de la corona de la fresa en Bélgica (Van Hemelrijck et al. 2017). En Vietnam y Bangladesh reportaron a *Pestalotiopsis* sp. como agente causal de la pudrición de corona (Dũng et al. 2016; Ara et al. 2017). Es importante mencionar que, en estas investigaciones, la identificación se basó en la morfología del patógeno. En México, se ha reportado a *Pestalotiospis* sp. como agente causal de manchas foliares y antracnosis, la identificación del patógeno se basó en la morfología y la amplificación de la región completa del ITS (ITS1 e ITS2) (Morales-Mora et al. 2019).

En los últimos cinco años se han mencionado cuatro especies del género *Neopestalotiopsis* ocasionando daños severos en el cultivo de fresa. *N. clavispora* fue reportado por Chamorro et al. (2016) como agente causal de la pudrición de raíz y corona de fresa en España, así mismo, en Argentina la reportó Obregón et al. (2018), posteriormente, una serie de reportes en varios países como Uruguay (Machin et al. 2019), Corea del Sur (Park et al. 2019) e Italia (Gilardi et al. 2019; Sigillo et al. 2020). En la India se reportó como el agente causal de manchas foliares y pudrición de fruto (Mahapatra et al. 2018) y recientemente se reportó en China como agente causal del tizón del cáliz y receptáculo (Shi et al. 2021). En todos los casos la identificación se basó en la descripción de las características morfológicas y en la identificación por PCR mediante secuenciación.

Aunque *N. clavispora* se reportó por algún tiempo como responsable de manchas foliares y pudrición de corona, los reportes coinciden en que la identificación se realizó mediante morfología y secuenciación de las regiones ITS, en algunas investigaciones se utilizaron secuencias parciales de los genes TEF y β -tubulina. Sin embargo, en Egipto se realiza el primer reporte mundial de *N. rosae* como agente causal de la pudrición de raíz y corona (Essa et al. 2018), posteriormente en México se reporta a esta especie como agente causal de pudrición de raíz, corona y mancha foliar (Rebollar-Alviter et al. 2020), en Taiwán como causante de tizón de hoja y pudrición de corona (Wu et al. 2020), en China como causante de pudrición

de raíz (Sun et al. 2021), en Canadá como agente causal de machas foliares (Goldenhar y Pate, 2021) y en Estados Unidos como responsable de manchas foliares y pudrición de fruto (Baggio et al. 2021). En todos los casos, los autores reportaron la identificación multilocus mediante secuenciación de la región ITS y parcial de los genes TEF y Tubulina. Es probable que los reportes previos, basados solo en la región ITS, en realidad, correspondan a *N. rosae*, debido a que esta región no es lo suficientemente informativa para separar ambas especies. Recientes investigaciones han demostrado que *N. clavispora* reportada por Chamorro et al. (2016) debe considerarse como *N. rosae*; con base en el análisis filogenético que considera secuencias de varios aislamientos de fresa de Florida en Estados Unidos (Baggio et al. 2021), esta última ha sido previamente reportada también en Brasil (Camili et al. 2002; Rodrigues et al. 2014; Teixeira et al. 2015).

Aunque con menor frecuencia, otras especies de *Neopestalotiopsis* se han reportado como agente causal de pudrición en corona y raíz en el cultivo de fresa son *N. mesopotamica* y *N. iranensis* reportada en Irán (Ayoubi y Soleimani, 2016) y en Ecuador (Hidrobo et al. 2021; Intriago-Reyna et al. 2021). *Neopestalotiopsis iranensis*, *N. mesopotamica* y *N. rosae*, son muy similares y solo se diferencian mediante análisis filogenético, los síntomas causados por estas especies son difíciles de reconocer en campo.

La información disponible hasta ahora no deja dudas de que la pudrición de corona y el tizón foliar de la fresa son las enfermedades emergentes de mayor importancia económica de alcance global, a la cual se asocia principalmente *N. rosae*, y en menor medida *N. mesopotamica*, *N. iranensis*, *Neopestalotiopsis* sp. y probablemente algunas nuevas especies aun en estudio. Dicha enfermedad sigue afectando de manera severa el cultivo y es motivo de preocupación para los productores, ya que cuando las condiciones ambientales o de manejo del cultivo son favorables para el desarrollo de las epidemias, las pérdidas son cuantiosas. La dispersión del patógeno en gran medida podría estar asociada al comercio global de plántulas de fresa.

1.1.5.1. Hospedantes

Pestalotiopsis y *Neopestalotiopsis* no son patógenos específicos de un hospedante, ya que se han reportado enfermedades asociadas con especies de estos géneros en múltiples taxones vegetales. En el cuadro 1 se mencionan algunos hospedantes más comunes de las cuatro especies de *Neopestalotiopsis* que se han reportado en fresa.

Cuadro 1. Hospedantes de *Neopestalotiopsis* spp. reportadas atacando el cultivo de fresa.

Especie	Hospedante	Origen	Cita
<i>N. clavispora</i>	Madera en descomposición <i>Magnolia</i> sp.	Sri Lanka China	(Maharachchikumbura et al. 2014; Chamorro et al. 2016; Obregón et al. 2018; Machin et al. 2019; Park et al. 2019; Gilardi et al. 2019; Sigillo et al. 2020)
	<i>Fragaria x ananassa</i>	España, Argentina, Uruguay, Corea del Sur,	(Lee et al. 2019)
	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Italia Korea	
	<i>Camellia chrysantha</i>		(Zhao et al. 2020)
	<i>Camellia oleífera</i>	China China	(Sessa et al. 2018)
	<i>Macadamia integrifolia</i>	Australia, Brasil, China	(Santos et al. 2019; Qiu et al. 2020; Prasannath and Akinsanmi 2020)
	<i>Mangifera indica</i>	China	(Shu et al. 2020)
<i>N. mesopotamica</i>	<i>Eucalipto</i> sp.	-	
	<i>Pino brutis</i>		
	<i>Achras zapote</i>	Irak	(Maharachchikumbura et al. 2014; Ayoubi y Soleimani, 2016)
	<i>Fragaria x ananassa</i>	India	

<i>N. rosae</i>	<i>Rosa</i> sp.	Nueva	(Maharachchikumbura et al. 2014; Essa et al. 2018; Rodríguez-Gálvez et al. 2020; Xavier et al. 2021)
	<i>Paeonia</i>	Zelanda	
	<i>sufruticola</i>	Estados	
	<i>Punica granatum</i>	Unidos	
	<i>Fragaria x ananassa</i>	Estados	
	<i>Vaccinium</i>	Unidos	
	<i>corymbosum</i>	Egipto	
	<i>Crotalaria juncea</i>	Perú	
	<i>Dalbergia</i> sp.	India	
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	<i>Cocos nucifera</i>	-	(Maharachchikumbura et al. 2014; Baggio et al. 2021)
	<i>Camelia</i> sp.	Indonesia	
	<i>Achras zapote</i>	Francia	
	<i>Vitis vinifera</i>	India	
	<i>Erica</i> sp.	India	
	<i>Fragaria x ananassa</i>	Alemania	
		Estados	
		Unidos	

1.2. Ciclo de vida y epidemiología

Durante varios años las especies de *Pestalotiopsis* se han considerado como hongos oportunistas (Maharachchikumbura et al. 2011). Sin embargo, con las epidemias emergentes de los últimos 5 años en el mundo, dicha información podría no aplicar en la actualidad, pues queda claro que tanto las epidemias que surgen en el mundo como las que ocurren en México han sido devastadoras. Daños importantes se han reportado en al menos 21 países. Al menos para el caso de *N. rosae*, la categoría de oportunista es cuestionable.

Las estructuras infectivas del patógeno son los conidios que al entrar en contacto con el hospedante susceptible inicia el proceso de infección. Los conidios tienen un papel importante, estos se producen en conidiomas formados en lesiones preexistentes en condiciones de elevada humedad relativa. Cuando los conidios entran en contacto con el tejido a consecuencia de la dispersión principalmente por salpique, emiten un tubo germinativo que penetra a través de la cutícula y la epidermis infectando el tejido interno (Fig. 1). La germinación de los conidios se ve favorecida por la alta humedad relativa y largos periodos de humedad sobre las

hojas (Maharachchikumbura et al. 2011; Rodrigues et al. 2014; Rebollar-Alviter et al. 2020).

En el caso de *P. longisetula*, se determinó que el proceso de infección inicia a las 48 horas después de la inoculación, los conidios germinan y a las 72 horas producen tubos germinativos, a las 96 horas las hifas invaden intracelularmente las células y se formaron los acervulos y 144 horas después de la inoculación se completa el ciclo con la liberación de los conidios (Rodrigues et al. (2014). Por otro lado, el inóculo secundario producido puede causar infecciones secundarias aumentando la intensidad de la enfermedad. Es probable que la intensidad de la enfermedad se incremente en condiciones de estrés biótico o abiótico (Sánchez-Fernández et al. 2013) o incluso que el patógeno permanezca o actúe como endófito por un periodo determinado como en *P. microspora* (Lee et al. 1995), por lo que, muchas especies patógenas permanecen inactivas no presentando síntomas hasta que hay un estrés en la planta o hasta que las condiciones son favorables para manifestar su patogénesis (Tejesvi et al. 2009). La lluvia es otro factor importante para el desarrollo de la enfermedad, pues contribuye al salpique cuando los conidios se producen en el interior de los acérvulos (Espinoza et al. 2008).

Las especies del género *Neopestalotiopsis* pueden causar enfermedad en diferentes condiciones climáticas o ambientales debido a su amplia adaptabilidad. La intensidad de la enfermedad se ve favorecida a temperaturas que va de 23 a 27 °C (Rebollar-Alviter et al. 2020) y de 95-100 % de humedad relativa (Dung et al. 2006). En condiciones *in vitro* la temperatura óptima para el desarrollo y esporulación van de 21-30 °C (Rebollar-Alviter et al. 2020; Baggio et al. 2021). Algunas fitotoxinas que ayudan al desarrollo del patógeno para causar enfermedad son pestalpironas, hidroxipestalopironas y pestalosidos (Lee et al. 1995; Evidente et al. 2012).

La sobrevivencia de *Pestalotiopsis* spp. se puede presentar en diversas partes de la planta o sustratos y actuar como fuente de inóculo primario. Las fuentes de sobrevivencia de *P. sydowiana* en viveros de *Calluna vulgaris* incluyen la planta madre, suelo, bandejas de propagación usadas, revestimiento de piso y polvo de

pasillos de invernadero, así como en restos de cultivo (McQuilken y Hopkins, 2001, 2004).

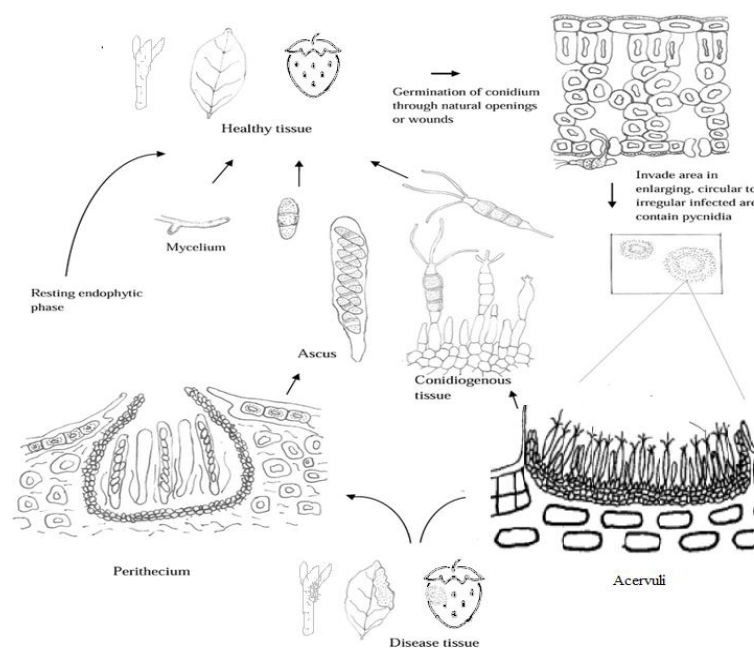


Figura 1. Ciclo de vida de *Pestalotiopsis* spp. propuesto por Nag Rag 1993; Kobayashi et al. 2001; Maharachchikumbura et al. 2011, modificado por Acosta-González (2022).

1.3. Diseminación

Al interior de las parcelas, la lluvia es uno de los principales medios de dispersión de *Neopestalotiopsis* spp. ya que al golpetear sobre las estructuras del hongo conocida como acervulos ocasiona la liberación de los conidios, los cuales pueden iniciar la infección cuando los tejidos cuentan con agua libre sobre su superficie (Rebollar-Alviter et al. 2020; Baggio et al. 2021). Otro medio de dispersión es el aire, sin embargo, el material propagativo obtenido de los viveros es el medio de dispersión más efectivo a largas distancias. Se especula que este ha sido el principal medio por el cual la enfermedad se ha dispersado a varias partes del mundo.

1.4. Manejo de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* spp.

Por ser una enfermedad emergente en el cultivo de fresa existe poca información acerca del manejo de este patógeno; sin embargo, se pueden implementar ciertas medidas para reducir la incidencia en el ámbito cultural, biológico y químico bajo una perspectiva epidemiológica que considere las fuentes de infección primaria.

1.4.1. Prácticas culturales

Debido a que *Neopestalotiopsis* y *Pestalotiopsis* puede sobrevivir en residuos de cultivo, así como en el suelo (McQuilken y Hopkins 2001, 2004), es necesario comenzar un manejo reduciendo fuentes de inóculo primario por lo que, se tiene que realizar un manejo cultural adecuado. El manejo cultural consiste en la utilización de prácticas agrícolas y algunos métodos de planeación alternativos de manera preventiva permitiendo disminuir la abundancia del patógeno del suelo, dentro de estas medidas se encuentra el uso de planta libre de patógenos, desinfestación del suelo, uso de riegos ligeros y frecuentes, fertilizaciones balanceadas, utilización de enmiendas orgánicas, solarización y biofumigación (Lamers et al. 2010; Iriarte et al. 2011). Para el uso adecuado de estas prácticas agrícolas se requiere de conocimientos básicos sobre la fisiología, fenología y características agronómicas del cultivo, si bien el desconocimiento de los factores mencionados anteriormente puede conducir a problemas fitosanitarios, la desinfestación anaeróbica ha demostrado tener eficacia en el control de patógenos del suelo como en algunos sistemas de producción de fresa, tomates, melones, flores de corte entre otros cultivos (Koike y Gordon 2015; Strauss y Kluepfel, 2015).

1.4.2. Tácticas biológicas

El control biológico es una alternativa de manejo de las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos. Algunos microorganismos utilizados con frecuencia en la agricultura son los géneros *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. Las especies de *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* causan severos daños en el cultivo de fresa por lo que pueden ser una alternativa para su control, no escatimando posibles

resultados negativos como lo observado con aplicaciones de trichodermil (*Trichoderma harzianum*) que no inhibió el crecimiento de *P. longisetula* en condiciones *in vitro* (Texeira et al. 2015). Sin embargo, *Trichoderma asperellum* evaluado contra *N. clavispora* agente causal del tizón de la hoja de fresa, en condiciones *in vitro*, presentó una eficacia de inhibición del 66.67%, de la misma manera, evaluaron a *Pseudomonas fluorescens* con un 56.67% de inhibición (Amrutha y Vijayaraghavan, 2018). En México, se han realizado pruebas duales de confrontación entre *T. harzianum* y *Pestalotiopsis* sp. aislado de hojas de fresa, donde obtuvieron un 71.1% de inhibición del crecimiento radial y un grado 2 en la escala de Bell (Morales-Mora et al. 2019). Asimismo, *T. harzianum* evaluado contra *Pestalotiopsis* sp. agente causal de la pudrición de corona de la fresa en condiciones *in vitro* presentó una inhibición del 32 %; adicionalmente, se aplicó esta misma cepa directamente en tres variedades de fresa siendo Early Bright y Tokii quien presentó mayor resistencia a la enfermedad (Widyaningsih y Triasih, 2021).

En cuanto al género *Bacillus* spp. se ha reportado como antagonista de *Pestalotiopsis* sp. en otros cultivos. Se ha documentado que *B. amyloliquefaciens* inhibió el 85 % del crecimiento de *P. guepini* (Zhang et al. 2014). Por otra parte, se evaluó la respuesta de *Pestalotiopsis* sp. aislada de frutos de mango a la acción de *Bacillus subtilis*, se determinó el 42.55 % de inhibición del crecimiento bajo condiciones *in vitro*. Respecto al género *Streptomyces* spp. puede producir hasta 100 compuestos antimicrobianos distintos y de utilidad en el control biológico (Gontang et al. 2007). Se ha demostrado que cepas de *Streptomyces* spp. inhibieron en un 100% el crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. aislado de frutos de guanábana (Cambero et al. 2020).

1.4.3. Tácticas químicas

Actualmente no existen fungicidas registrados para el control de *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo de fresa. Sin embargo, se han realizado algunos estudios donde se han reportado productos con efectos positivos sobre la sensibilidad de *Neopestalotiopsis* spp. en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Ensayos realizados *in vitro* concluyendo que el thiram e hymexazole inhibieron el crecimiento micelial de *N.*

rosae a 1000 y 1250 ppm respectivamente. Adicionalmente, los resultados obtenidos en ensayos *in vivo* demostraron que el thiram redujo la incidencia de la enfermedad con una eficacia del 80-82.05 % seguido de hymexazole con 79.07 % (Essa et al. 2018). Por otra parte, en evaluaciones realizadas para determinar la respuesta de 38 aislamientos de *Neopestalotiopsis* sp. a diferentes fungicidas indicó que captan y fludioxonil inhibieron el crecimiento micelial, asimismo corroboraron la resistencia a fungicidas Qol por presencia de mutación G143A en el gen *cytb* (Baggio et al. 2019). En México, *N. rosae* fue sensible a cyprodinil + fludioxonil, captan, iprodiona, difenoconazole y procloraz en un 100 % (Rebollar-Alviter et al. 2020).

También se ha reportado que los fungicidas cyprodinil + fludioxonil y Thiram presentaron eficacia en el control de *Neopestalotiopsis* sp. en la pudrición de frutos de fresa presentando solo 9.0 y 13.0 % de incidencia de la enfermedad en tratados con los fungicidas mencionados y, además, el clorotalonil, mancozeb, fluazinam y fludioxonil + pydiflumetofen presentan cierto grado de control con 13.8, 17.3, 14.7 y 14.7 % de incidencia respectivamente (Baggio y Peres, 2020).

1.5. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press. 5° ed. San Diego, CA. USA. 921 p.
- Ara, T., Monzur, S., Saand, M. A., Islam, R., Alam, S., and Hossain, M. 2017. The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. Int. J. Biosci. 11: 350-358.
- Ayoubi, N., and Soleimani, M. J. 2016. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis asiatica* causing leaf spot on sweet almond. J. Plant Pathol. 98: 321-325.
- Baggio, J. S., Cordova, L. G., and Peres, N. A. 2019. Sources of inoculum and survival of *Macrophomina phaseolina* in Florida strawberry fields. Plant Dis. 103: 2417-2424.
- Baggio, J., Forcelini, B. B., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., and Peres, N. 2019. Characterization, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Pestalotiopsis* spp. on strawberry in the US. Phytopathol. 109: 109-109.
- Baggio, J. S., and Peres, N. A. 2020. *Pestalotia* Leaf Spot and Fruit Rot of Strawberry: PP357, 9/2020. EDIS, 2020(5).
- Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., and Peres, N. A. 2021. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. Plant Dis. 105: 305-315.
- Belisário, R., Aucique-Pérez, C. E., Abreu, L. M., Salcedo, S. S., Oliveira, W. D., and Furtado, G. Q. 2020. Infection by *Neopestalotiopsis* spp. occurs on unwounded *eucalyptus* leaves and is favoured by long periods of leaf wetness. Plant Pathol. 69: 194-204.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S. A., Lane, C. R., Thon, M. R., Vannacci, G., Holub, E., and Sreenivasaprasad, S. 2015. Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. PLoS One, 10: e0129140.
- Barr, M. E. 1975. *Pestalosphaeria*, a new genus in the *Amphisphaeriaceae*. Mycol. 67: 187-194.
- Bezerra, J. D. P., Machado, A. R., Firmino, A. L., Rosado, A. W. C., Souza, C. A. F. D., Souza-Motta, C. M. D., Freire, K. T. L. D. S., Paivata, L. M., Magalhães, O. M. C., Pereira, O. L., Crous, P. W., Oliveira, T. G. L. D., Abreu, V. P. D., and

- Fan, X. 2018. Mycological diversity description I. Acta Botanica Brasilica. 32: 656-666.
- Bi, Y., Guo, W., Zhang, G. J., Liu, S. C., and Yang, B. D. 2017. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose of strawberry in China. Plant Dis. 101: 250.
- Borrero, C., Castaño, R., and Avilés, M. 2018. First report of *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain. Plant Dis. 102: 1178-1178.
- Brunner, I., Fischer, M., Rüthi, J., Stierli, B., and Frey, B. 2018. Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. PLoS one. 13: e0202047.
- Cadamuro, R. D., da Silveira Bastos, I. M. A., Silva, I. T., da Cruz, A. C. C., Robl, D., Sandjo, L. P., Jr, S. A., Lorenzo, J. M., Lazaro, R. D., Treichel, H., Steindel, M., and Fongaro, G. 2021. Bioactive compounds from mangrove endophytic fungus and their uses for microorganism control. J. Fungi. 7: 455.
- Camili, E. C., Carbonari, M., and de Souza, N. L. 2002. Characterization of *Pestalotiopsis longisetula* and its pathogenicity in strawberry. Summa Phytopathol. 28: 213-214.
- Cao, P., Fang, Y., Zheng, Z., Han, X., Zou, H., and Yan, X. 2022. Occurrence of *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on *Dendrobium officinale* in China. Plant Dis. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2432-PDN>
- Chamorro, M., Aguado, A., and De los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. Plant Dis. 100: 1495.
- Chen, C. Q., Zhang, B., and Gao, J. 2010. Leaf spot disease of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) caused by *Pestalotiopsis photiniae* newly reported in China. New Disease Reports. 22: 31-31.
- Chen, Y., Zhang, A. F., Yang, X., Gu, C. Y., Kyaw, E. P., Yi, X. K., and Xu, Y. L. 2016. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing twig blight on highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Anhui province of China. Plant Dis. 100: 859.
- Costa, L. A., and Gusmão, L. F. P. 2015. Characterization saprobic fungi on leaf litter of two species of trees in the Atlantic Forest, Brazil. Brazilian J. Microbiol. 46: 1027-1035.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Cheewangkoon, R., Carnegie, A. J., Burgess, T. I., Summerell, B. A., Edwards, J., Taylor, P. W. J., and Groenewald, J. Z. 2019. Foliar pathogens of *eucalypts*. Stud. Mycol. 94: 125-298.

- Cregut, M., Bedas, M., Durand, M. J., and Thouand, G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnol adv.* 31: 1634-1647.
- Daengsuwan, W., Wonglom, P., Arikrit, S., and Sunpapao, A. 2021. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavispora* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. *Hort. Plant J.* 7: 573-578.
- Darapanit, A., Boonyuen, N., Leesutthiphonchai, W., Nuankaew, S., and Piasai, O. 2021. Identification, pathogenicity and effects of plant extracts on *Neopestalotiopsis* and *Pseudopestalotiopsis* causing fruit diseases. *Scient reports.* 11: 1-11.
- Das, K., Lee, S. Y., and Jung, H. Y. 2021. *Pestalotiopsis kaki* sp. nov., a Novel Species Isolated from Persimmon Tree (*Diospyros kaki*) Bark in Korea. *Mycobiol.* 49: 54-60.
- De Notaris, G. 1839. *Micromycetes italiei* Dec II. *Mere R Acad Sci Torino* II, 3, 80-81.
- Deshmukh, S. K., Prakash, V., and Ranjan, N. 2017. Recent advances in the discovery of bioactive metabolites from *Pestalotiopsis*. *Phytochem Rev.* 16: 883-920.
- Diogo, E., Gonçalves, C. I., Silva, A. C., Valente, C., Bragança, H., and Phillips, A. J. 2021. Five new species of *Neopestalotiopsis* associated with diseased *Eucalyptus* spp. in Portugal. *Mycol Progress.* 20: 1441-1456.
- Duangkaew, P., and Monkhung, S. 2021. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* BL-59 to control some important postharvest diseases of mango fruits (*Mangifera indica* L.). *I. J. Agricul Technol.* 17: 2053-2066.
- Dube, H. C., and Bilgrami, K. S. 1965. Variations in the conidial morphology of *Pestalotiopsis darjeelingensis* in culture. *Curr. Sci.* 34: 487-487.
- Dũng, L., Diên, N. T., Đại, P. H., and Tuấn, P. N. 2016. The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberries in Dalat. *Dalat Univ. J. Sci.* 364-376.
- Edger, P. P., Poorten, T. J., VanBuren, R., Hardigan, M. A., Colle, M., McKain, M. R., Smith, R. D., Teresi, S. J., Nelson, A. D. L., Wai, C. M., Alger, E. I., Bird, K. A., Yocca, A. E., Pumpin, N., Ou, S., Acharya, C. B., Cole, G. S., Mower, J. P., Childs, K. L., Jiang, N., Lyons, E., Freeling, M., Puzey, J. R., and Knapp, S. J. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nat. Genet.* 51: 541.

- Elahi, A., Bukhari, D. A., Shamim, S., and Rehman, A. 2021. Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. *Journal of King Saud University-Science*. 33: 101538.
- Ellis, M. A., Kuter, G. A., and Wilson, L. L. 1984. Fungi that cause cane cankers on thornless blackberry in Ohio. *Plant Dis*. 68: 812-815.
- Embaby, E. M. 2007. *Pestalotia* fruit rot on strawberry plants in Egypt. *Egypt. J. Phytopathol*. 35: 99-110.
- Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Keith, L. M., and Latorre, B. A. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Dis*. 92: 1407-1414.
- Essa, T. A., Kamel, S. M., Ismail, A., and El-Ganainy, S. 2018. Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. *Egypt. J. Phytopathol*. 46: 1-19.
- Evidente, A., Zonno, M. C., Andolfi, A., Troise, C., Cimmino, A., and Vurro, M. 2012. Phytotoxic α -pyrones produced by *Pestalotiopsis guepinii*, the causal agent of hazelnut twig blight. *J. Antibiot*. 65: 203-206.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT. 2020. Producción datos. (<https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize> consultado 3-01-22).
- Freitas, E. F., Da Silva, M., Barros, M. V., and KASUYA, M. C. 2019. *Neopestalotiopsis hadrolaeliae* sp. nov., a new endophytic species from the roots of the endangered orchid *Hadrolaelia jongheana* in Brazil. *Phytotaxa*. 416: 211-220.
- Gerardo-Lugo, S. S., Tovar-Pedraza, J. M., Maharachchikumbura, S. S., Apodaca-Sánchez, M. A., Correia, K. C., Saucedo-Acosta, C. P., Camacho-Tapia, M., Hyde, K. D., Marraiki, N., Elgorban, A. M., and Beltrán-Peña, H. 2020. Characterization of *Neopestalotiopsis* species associated with mango grey leaf spot disease in Sinaloa, Mexico. *Pathogens*. 9: 788.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., and Battino, M. 2012. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28: 9-19.
- Gilardi, G., Bergeretti, F., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2019. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry in Italy. *Plant Dis*. 103: 2959-2959.
- Goldenhar, K., and Pate, E. 2021. Pest Alert: *Neopestalotiopsis* – an emerging strawberry disease in North America. Available online

<https://onfruit.ca/2021/03/11/pest-alert-neopestalotiopsis-an-emerging-strawberry-disease-in-north-america/>

- Gontang, E. A., Fenical, W., and Jensen, P. R. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3272-3282.
- González, P., Alaniz, S., Montelongo, M. J., Rauduviniče, L., Rebellato, J., Silvera-Pérez, E., and Mondino, P. 2012. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on blueberry in Uruguay. *Plant Dis.* 96: 914-914.
- Griffiths, D. A., and Swart, H. J. 1974. Conidial structure in *Pestalotia pezizoides*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63: 169-IN27.
- Guba, E. F. 1961. Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia*. Harvard Univ. Press, Mass, Cambridge.
- Hamzah, T. N. T., Ozturk, M., Altay, V., and Hakeem, K. R. 2020. Insights into the bioactive compounds of endophytic fungi in mangroves. In *Biodiversity and Biomedicine* (pp. 277-292). Academic Press.
- Hidrobo, J., Ramirez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Herrera, K., and Leon-Reyes, A. 2021. First report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on strawberry in Ecuador. *Plant Dis.* 106: 1066.
- Howard, C. M., and Albregts, E. E. 1973. Strawberry fruit rot caused by *Pestalotia longisetula*. *Phytopathol.* 63: 862-863.
- Hyde, K. D., Tennakoon, D. S., Jeewon, R., Bhat, D. J., Maharachchikumbura, S. S., Rossi, W., ... and Doilom, M. 2019. Fungal diversity notes 1036–1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. *Fungal Divers.* 96: 1-242.
- Intriago-Reyna, H. O., Rivas-Figueroa, F. J., Rivera-Casignia, Á. M., and Álvarez-Romero, P. I. 2021. Outbreaks of crown rot in *Fragaria × ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador. *Emir J. Food Agric.* 33: 520-527.
- Iriarte, L. E., Sosa M. C. y Reybet G. E. 2011. Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de *Fusarium oxysporum* en el suelo. *Rev. Invest. Agropec.* 37: 231-237.
- Ishiguro, Y., Otsubo, K., Watanabe, H., Suzuki, M., Nakayama, K., Fukuda, T., Suga, H., and Kageyama, K. 2014. Root and crown rot of strawberry caused by *Pythium helicoides* and its distribution in strawberry production areas of Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 423-429.

- Jiang, N., Bonthond, G., Fan, X. L., and Tian, C. M. 2018. *Neopestalotiopsis rosicola* sp. nov. causing stem canker of *Rosa chinensis* in China. Mycotaxon, 133: 271-283.
- Keith, L. M., Velasquez, M. E., and Zee, F. T. 2006. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. Plant Dis. 90: 16-23.
- Kobayashi, T., Ishihara, M., and Ono, Y. 2001. A new species of *Pestalosphaeria*, the teleomorph of *Pestalotiopsis neglecta*. Mycoscience. 42: 211-216.
- Koike, S. T., and Gordon, T. R. 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. Crop Prot. 73: 67-72.
- Lamers, J. G., Runia, W. T., Molendijk, L. P. G. and Bleeker, P. O. 2010. Applied. Plant Research for Arable Farming and Field Production of Vegetables. Wageningen University and Research, 8p.
- Lee, S., Crous, P. W., and Wingfield, M. J. 2006. *Pestalotioid* fungi from Restionaceae in the Cape floral kingdom. Stud. Mycol. 55: 175-178.
- Lee, Y., Kim, G. H., Kim, Y., Park, S. Y., and Koh, Y. J. 2019. First report of twig dieback caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on blueberry in Korea. Plant Dis. 103: 1022.
- Li, L., Yang, Q., and Li, H. 2021. Morphology, phylogeny, and pathogenicity of *Pestalotioid* species on *Camellia oleifera* in China. J. Fungi. 7: 1080.
- Liston, A., Cronn, R., and Ashman, T. L. 2014. *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. Am. J. Bot. 101: 1686-1699.
- Liu, J., He, J., Xue, R., Xu, B., Qian, X., Xin, F., Blank, L. M., Zhou, J., Wei, R., Dong, W., and Jiang, M. 2021. Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: progress, challenges, and prospects. Biotechnol Advan. 48: 107730.
- Luan, Y. S., Shang, Z. T., Su, Q., Feng, L., and An, L. J. 2008. First report of a *Pestalotiopsis* sp. causing leaf spot of blueberry in China. Plant Dis. 92: 171-171.
- Machín, A., González, P., Vicente, E., Sánchez, M., Estelda, C., Ghelfi, J., and Silvera-Pérez, E. 2019. First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on strawberry in Uruguay. Plant Dis. 103: 2946-2946.

- Mahapatra, S., Banerjee, J., Kumar, K., Pramanik, S., Pramanik, K., Islam, S., and Das, S. 2018. Leaf spot and fruit rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Indo-Gangetic plains of India. Ind. Phytopathol. 71: 279-283.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., and Crous, P. W. 2014. Pestalotiopsis revisited. Stud. Mycol. 79: 121-186.
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., and Hyde, K. D. 2011. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Divers. 50: 167-187.
- Marin, M. V., Seijo, T., Oliveira, M. S., Zuchelli, E., Mertely, J., and Peres, N. A. 2018. First report of *Phytophthora nicotianae* causing crown rot of strawberry in the United States. Plant Dis. 102: 1463-1463.
- McQuilken, M. P., and Hopkins, K. E. 2001. Sources, survival and management of *Pestalotiopsis sydwiana* on *Calluna vulgaris* nurseries. Crop Prot. 20: 591-597.
- McQuilken, M. P., and Hopkins, K. E. 2004. Biology and integrated control of *Pestalotiopsis* on container-grown ericaceous crops. Pest Management Science: formerly Pesticide Science. 60: 135-142.
- Mora, A. G., Noriega, C. D. H., and Pérez, B. M. H. 2017. El mango: su cultivo, fitosanidad y comercialización. Primera edición. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco Estado de México.
- Moreau, C. 1949. Micomycetes africains. I. Revue de Mycologie, Suppliment Colonial (Paris), 14: 15-22.
- Mormile, P., Stahl, N., and Malinconico, M. 2017. The world of plasticulture. In Soil degradable bioplastics for a sustainable modern agriculture (pp. 1-21). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mouden, N., Benkirane, R., Touhami, A. O., and Douira, A. 2014. Pathogenic capacity of *Pestalotia longisetula* Guba reported for the first time on strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) in Morocco. Int. J. Pure. App. Biosci. 2: 132-41.
- Naik, B. S. 2020. Biosynthesis of silver nanoparticles from endophytic fungi and their role in plant disease management. Microbial Endophytes. 2020: 307-321.
- Nair, H. H., Alex, V. V., and Anto, R. J. 2021. Significance of nutraceuticals in cancer therapy. In Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules (pp. 309-321). Academic Press.
- Nag Raj, T. R. 1985. Redisposals and redescriptions in the Monochaetia-Seiridium, Pestalotia-Pestalotiopsis complexes. II. *Pestalotiopsis besseyii* (Guba) comb. nov. and *Pestalospaeria varia* sp. nov. Mycotaxon (USA).

- Nag Raj, T. R. 1993. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycol publ. ISBN 100969223722.
- NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2022. (Consultado 22-05-22) en línea (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1562205&mode=info>)
- Norphanphoun, C., Jayawardena, R. S., Chen, Y., Wen, T. C., Meepol, W., and Hyde, K. D. 2019. Morphological and phylogenetic characterization of novel *pestalotioid* species associated with mangroves in Thailand. Mycosphere. 10: 531-578.
- Obregón, V. G., Meneguzzi, N. G., Ibañez, J. M., Lattar, T. E., and Kirschbaum, D. S. 2018. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. Plant Dis. 102: 1856-1856.
- Park, K., Han, I., Lee, S. M., Choi, S. L., Kim, M. C., and Lee, H. 2019. Crown and root rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. Korean. J. Mycol. 47: 427-435.
- Prakash, C. P., Thirumalai, E., Rajulu, M. G., Thirunavukkarasu, N., and Suryanarayanan, T. S. 2015. Ecology and diversity of leaf litter fungi during early-stage decomposition in a seasonally dry tropical forest. Fungal Ecol. 17: 103-113.
- Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Negi, C., Yadav, A. N., Yadav, N., Singh, K., and Saxena, A. K. 2020. Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. In Microbial Endophytes (pp. 273-305). Woodhead Publishing.
- Ranjan, A., Singh, R. K., and Singh, M. 2021. Metabolic versatility of fungi as a source for anticancer compounds. In Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules (pp. 191-207). Academic Press.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., and Parra-Robles, B. E. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. Plant Dis. 104: 2054-2059.
- Rodrigues, F. A., Silva, I. T., Antunes Cruz, M. F., and Carré-Missio, V. 2014. The Infection Process of *Pestalotiopsis Longisetula* Leaf Spot on Strawberry Leaves. J. Phytopathol. 162: 690-692.
- Rodríguez-Gálvez, E., Hilário, S., Lopes, A., and Alves, A. 2020. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. Eur. J. Plant Pathol. 157: 89-102.

- Russell, J. R., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A. G., Dantzler, K. W., Hickman, D., and Strobel, S. A. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *App. Environ Microbiol.* 77: 6076-6084.
- Salazar-Cerezo, S., Martinez-Montiel, N., Cruz-Lopez, M. D. C., and Martinez-Contreras, R. D. 2018. Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. *Front Microbiol.* 9: 612.
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., y Macías-Rubalcava, M. L. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 16: 132-146.
- Santos, C. C., Domingues, J. L., Santos, R. F., Spósito, M. B., Santos, A., and Novaes, Q. S. 2019. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on macadamia in Brazil. *Plant Dis.* 103: 1790-1790.
- Santos, G. S., Mafia, R. G., Aguiar, A. M., Zarpelon, T. G., Damacena, M. B., Barros, A. F., and Ferreira, M. A. 2020. Stem rot of *eucalyptus* cuttings caused by *Neopestalotiopsis* spp. in Brazil. *J. Phytopathol.* 168: 311-321.
- Santos, J., Hilário, S., Pinto, G., and Alves, A. 2021. Diversity and pathogenicity of pestalotioid fungi associated with blueberry plants in Portugal, with description of three novel species of *Neopestalotiopsis*. *Eur J. Plant Pathol.* 162: 539–555.
- Shi, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Xue, C., Ma, Y., and Wang, F. 2021. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing calyx and receptacle blight on strawberry in China. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-21-1376-PDN>
- Shi, L. B., Li, Y., Fei, N. Y., Fu, J. F., and Yan, X. R. 2017. First report of *Neopestalotiopsis chrysea* causing twig dieback of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in China. *Plant Dis.* 101: 506-506.
- Shu, J., Yu, Z., Sun, W., Zhao, J., Li, Q., Tang, L., Guo, T., Huang, S., Mo, J., Hsiang, T., and Luo, S. 2020. Identification and characterization of pestalotioid fungi causing leaf spots on mango in southern China. *Plant Dis.* 104: 1207-1213.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SIAP. 2019. Cierres de producción agrícola. (<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/consultado> 3-01-22)
- Sieber, T. N. 2021. The phyllosphere mycobiome of woody plants. In *Forest Microbiology* (pp. 111-132). Academic Press.

- Sigillo, L., Ruocco, M., Gualtieri, L., Pane, C., and Zaccardelli, M. 2020. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. J. Plant Pathol. 102: 281-281.
- Solarte, F., Muñoz, C. G., Maharachchikumbura, S. S., and Álvarez, E. 2018. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., causal agents of guava scab in Colombia. Plant Dis. 102: 49-59.
- Staudt, G. 1962. Taxonomic studies in the genus *Fragaria* typification of *Fragaria* species known at the time of Linnaeus. Can. J. Bot. 40: 869-886.
- Stensvand, A., Herrero, M. L., and Talgø, V. 1999. Crown rot caused by *Phytophthora cactorum* in Norwegian strawberry production. EPPO Bulletin. 29: 155-158.
- Steyaert, R. L. 1949. Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). Bulletin du Jardin botanique de l'Etat, Bruxelles/Bulletin van den Rijksplantentuin, Brussel. 285-347.
- Strauss, S. L., and Kluepfel, D. A. 2015. Anaerobic soil disinfestation: a chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. J. Int. Agricul. 14: 2309-2318.
- Strobel, G., Ford, E., Worapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D. M., Fung, P. C. W., and Chau, R. M. W. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. Phytochemistry. 60: 179-183.
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., Yan, J., Zhang, W., and Li, X. 2021. Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. Crop Prot. 147: 105710.
- Sung, J. M., Song, Y. N., and Yang, S. S. 1985. Identification of *Cylindrocarpon destructans* associated with root rot disease of strawberry. Korean J. Mycol. 13: 179-183.
- Sutton, B. C. 1980. The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata (No. 589.24). Commonwealth Mycological Institute,
- Tanapichatsakul, C., Khruengsai, S., Monggoot, S., and Pripdeevech, P. 2019. Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves. PeerJ, 7, e6427.
- Tang, J., Du, Y., Lai, L., and Yang, Q. 2021. First report of *Neopestalotiopsis protearum* causing seed rot on *Camellia oleifera* in China. Plant Dis. 105: 4152.

- Teixeira, M. A., Martins, R. M. S., Vieira, R. F., Vildoso, C. I. A., Adami, A. A. V., and Ferreira, A. C. 2015. In vitro identification and control of *Pestalotiopsis longisetula* fungus, pathogens strawberry crop. Rev. Agrogeoam. 7: 59-65.
- Tejesvi, M. V., Tamhankar, S. A., Kini, K. R., Rao, V. S., and Prakash, H. S. 2009. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmaceutically important medicinal trees. Fungal Divers. 38: 167.
- Tennakoon, D. S., Kuo, C. H., Maharachchikumbura, S. S., Thambugala, K. M., Gentekaki, E., Phillips, A. J., Bhat, D. J., Wanasinghe, D. N., Silva, N. I. D., Promputtha, I., and Hyde, K. D. 2021. Taxonomic and phylogenetic contributions to *Celtis formosana*, *Ficus ampelas*, *F. septica*, *Macaranga tanarius* and *Morus australis* leaf litter inhabiting microfungi. Fungal Divers. 108: 1-215.
- Tibpromma, S., Hyde, K. D., McKenzie, E. H., Bhat, D. J., Phillips, A. J., Wanasinghe, D. N., Samarakoon, M. C., Jayawardena, R. S., Dissanayake, A. J., Tennakoon, D. S., Doilom, M., Phookamsak, R., Tang, A. M. C., Xu, J., Mortimer, P. E., Promputtha, I., Maharachchikumbura, S. S. N., Khan, S., and Karunarathna, S. C. 2018. Fungal diversity notes 840–928: micro-fungi associated with Pandanaceae. Fungal Divers. 93: 1-160.
- Tudor, V. C., Smedescu, D., Fintineru, G., Fintineru, A., Marcuta, A., and Iova, R. A. 2019. Plasticulture: Diffusion of Plastic Materials in the Agricultural Sector. Materiale Plastice. 56: 730.
- USDA. 2022. Natural Resources Conservation Service. Plants Database. (<https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=FRAGA> consultado 4-01-22)
- Van Hemelrijck, W., Ceustermans, A., Van Campenhout, J., Lieten, P., and Bylemans, D. (2016, August). Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. In VIII International Strawberry Symposium 1156 (pp. 781-786).
- Vasić, T., Jevremović, D., Krnjaja, V., Leposavić, A., Anđelković, S., Živković, S., and Paunović, S. 2017. Morphological description and molecular detection of *Pestalotiopsis* sp on hazelnut in Serbia. Spanish Journal of Agricultural Research, 15: e10SC02.
- Wang, S., Mi, X., Wu, Z., Zhang, L., and Wei, C. 2019. Characterization and pathogenicity of *Pestalotiopsis*-like species associated with gray blight disease on *Camellia sinensis* in Anhui province, China. Plant Dis. 103: 2786-2797.
- Widyaningsih, S., and Triasih, U. 2021. Biological Control of Strawberry Crown Rot Disease (*Pestalotiopsis* sp.) using *Trichoderma harzianum* and Endophytic Bacteria. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 752, No. 1, p. 012052). IOP Publishing.

- Wong, J. K. H., Lee, K. K., Tang, K. H. D., and Yap, P. S. 2020. Microplastics in the freshwater and terrestrial environments: Prevalence, fates, impacts and sustainable solutions. *Sci. Total Environ.* 719: 137512.
- Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., and Chung, P. C. 2020. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Dis.* 105: 487-487.
- Xavier, K. V., Yu, X., and Vallad, G. E. 2021. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing foliar and fruit spots on pomegranate in Florida. *Plant Dis.* 105: 504.
- Xue, D. S., Lian, S., Li, B. H., and Wang, C. X. 2018. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing root rot on blueberry in China. *Plant Dis.* 102: 1655-1655.
- Yang, X. L., Zhang, J. Z., and Luo, D. Q. 2012. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. *Nat. Prod. Rep.* 29: 622-641.
- Yang, Q., Zeng, X. Y., Yuan, J., Zhang, Q., He, Y. K., and Wang, Y. 2021. Two new species of *Neopestalotiopsis* from southern China. *Biodivers. Data J.* 9: e70446.
- Zhang, Y. L., Ge, H. M., Li, F., Song, Y. C., and Tan, R. X. 2008. New phytotoxic metabolites from *Pestalotiopsis* sp. HCO₂, a fungus residing in *Chondracis rosea* gut. *Chem. Biodivers.* 5: 2402-2407.
- Zhang, J., Ran, X., Zhu, T., Peng, Y., and Liu, Y. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* antimicrobial effect on *Pestalotiopsis guepini* (Desm.) Stey. *J. Northeast Forest. Univ.* 42: 122-125.
- Zhang, M., Jia, H., Weng, Y., and Li, C. 2019. Biodegradable PLA/PBAT mulch on microbial community structure in different soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 145: 104817.
- Zhang, D., Yu, J., Ma, C., Kong, L., He, C., and Li, J. 2021. Genomic Analysis of the Mycoparasite *Pestalotiopsis* sp. PG52. *Pol. J. Microbiol.* 70: 189.

CAPÍTULO II

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y VARIABILIDAD PATOGENICA DE AISLADOS DE *Neopestalotiopsis* spp. EN EL CULTIVO DE FRESA

RESUMEN

En los últimos cinco años varias regiones productoras de fresa se han visto afectadas, en el estado de Michoacán así, como otros estados y varias partes del mundo por *Neopestalotiopsis* spp., la cual se caracteriza por causar pudrición de corona y raíz, mancha foliar, pudrición de fruto, tizón de hoja, tizón de cáliz y receptáculo. El objetivo de esta investigación fue identificar mediante métodos moleculares y caracterizar morfológicamente los aislamientos obtenidos de diferentes órganos de plantas de fresa y determinar su variabilidad patogénica. Se realizó una colecta en quince regiones productoras de fresa del centro de México de donde se obtuvieron 498 aislamientos. Se seleccionó un subconjunto de 160 aislamientos. Este subconjunto se identificó mediante la técnica High-Resolution Melting (HRM). Los resultados indicaron que 159 aislamientos correspondieron a la especie *N. rosae* y uno se identificó como *Neopestalotiopsis* sp. 29 de estos aislamientos, se seleccionaron para realizar una caracterización morfológica y determinar la variabilidad patogénica en la variedad Fortuna. Además, se evaluó la susceptibilidad de once variedades de fresa a uno de estos aislamientos. Los resultados indicaron que hubo variabilidad morfológica y patogénica entre los aislamientos, la cual se manifestó por el período de incubación, nivel de severidad, y lamina foliar total afectada, demostrando que los aislamientos, 13, 16, 14, 24 y 10 fueron los que presentaron síntomas entre 12 y 24 horas después de la inoculación (HDI), y los que causaron lamina foliar afectada en la variedad inoculada. De las variedades inoculadas, Marisol se mostró como la menos susceptible a *N. rosae* y Fortuna la variedad más susceptible con un periodo de incubación menor y mayor severidad. Estos resultados indican que la especie predominante en las zonas productoras de fresa, en México es *N. rosae*, y que existe susceptibilidad diferencial de las variedades a esta especie de hongo.

Palabras clave: *Neopestalotiopsis rosae*, patogenicidad, HRM, fresa.

2.1. INTRODUCCIÓN

La fresa es atacada por varios patógenos entre ellos *Fusarium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Colletotrichum spp.*, *Macrophomina spp.* (Koike y Gordon, 2015; Marín et al. 2018; Nellist et al. 2019; Baggio et al. 2019; Jian et al. 2021). La pudrición de la corona y tizón foliar de es causada por *Neopestalotiopsis spp.*, enfermedad emergente a nivel mundial. En México, se ha presentado en todas las regiones productoras, donde se han perdido diversas hectáreas y cientos de miles de pesos. Además de afectar la corona y las hojas, el patógeno, afecta otros órganos de la planta (Chamorro et al. 2016; Obregón et al. 2018; Rebollar-Alviter et al. 2020; Sun et al. 2021).

En los últimos años se ha informado con frecuencia a *Neopestalotiopsis spp.* en diversas partes del mundo, este género surgió de una segregación de *Pestalotiopsis*, basado en un análisis filogenético multilocus y en la morfología de especies similares. Además, la secuencia del gen 28S (nrRNA) determinó la filogenia de la familia *Sporocadaceae* en la que se encuentran los géneros *Pestalotiopsis*, *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis* muy bien soportados por su morfología (Maharachchikumbura et al. 2014). Además, la utilización de la región del espacio transcrito interno (ITS) del rDNA y de secuencias parciales del factor de elongación (TEF) y β -tubulina (TUB) permitieron establecer claramente las diferencias entre los aislamientos ubicados en los tres nuevos géneros considerados previamente como *Pestalotiopsis*. *Neopestalotiopsis* se puede distinguir fácilmente de *Pestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis* por presentar conidios con las células medianas versicolores (Maharachchikumbura et al. 2014; Hyde et al. 2019; Tennakoon et al. 2021; Li et al. 2021).

La utilización de técnicas moleculares se ha convertido en la herramienta principal para estudios filogenéticos y para resolver problemas de delimitación de especies. Se utilizan regiones génicas conservadas para la identificación de especies fúngicas, una de las regiones más utilizada es la del ITS, sin embargo, en algunos casos la secuencia de esta región no tiene la información suficiente para diferenciar

entre especies estrechamente relacionadas. Por lo que, se ha empleado la filogenia multilocus, para establecer las relaciones filogenéticas entre especies y entre complejos de especies (Salicini et al. 2011).

En los últimos años se han reportado 4 especies del género *Neopestalotiopsis* ocasionando daños severos en el cultivo de fresa. *N. clavispora*, *N. rosae*, *N. mesopotámica* y *Neopestalotiopsis* sp. en diversas partes del mundo. Adicionalmente también se ha reportado a *N. iranensis*. La identificación se ha basado en morfología y mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los genes que han brindado más información son, el espacio transcrito interno (ITS) región del rDNA 5.8S, β -tubulina parcial (TUB), y las regiones del gen del factor de elongación de traducción parcial 1-alfa (TEF) (Maharachchikumbura et al. 2014).

N. clavispora se ha identificado utilizando la región completa del ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) y de los genes β -tubulina y TEF (Chamorro et al. 2016; Shi et al. 2021), aunque esta especie se ha identificado solo con la amplificación y secuenciación del ITS utilizando los iniciadores ITS1 e ITS4 (Obregón et al. 2018; Gilardi et al. 2019) y con los iniciadores ITS1 e ITS2 (Mahapatra et al. 2018). También se han realizado identificaciones solo con el gen TEF utilizando los iniciadores EF1-688F y EF1-1251R para reportar por primera vez a *N. clavispora* en Uruguay (Machin et al. 2019). En corea solo se utilizaron secuencias del ITS amplificados con los iniciadores ITS1-ITS4 y β -tubulina con bt2a-bt2b (Park et al. 2019). Inclusive para la identificación de esta especie se han utilizado dos regiones génicas, la del ITS amplificada y secuenciada con los iniciadores ITS1-ITS4 y actina con los iniciadores Triact 1-Triact 2 (Sigillo et al. 2020).

Para la identificación de *N. mesopotámica*, se implementaron la región del ITS y secuencias de los genes TEF y β -tubulina (Ayoubi et al. 2018; Hidrobo et al. 2021)., mientras que Intriago-Reyna et al. (2021) usaron la región del ITS y del gen TEF.

En cuanto a los reportes de *N. rosae* se han usado los tres genes recomendados (Maharachchikumbura et al. 2014). Estos reportes fueron realizados en Egipto (Essa et al. 2018), México (Rebollar-Alviter et al. 2020), Taiwan (Wu et al. 2020), China

(Sun et al. 2021) y Estados Unidos (Baggio et al. 2021). En todos los casos llegando a resultados similares. Por lo tanto, la filogenia múltiple es un método muy confiable para la identificación de este patógeno.

Adicionalmente se han implementado técnicas de identificación rápida en diversos patógenos. Una de las técnicas de identificación es High-Resolution Melting (HRM), la cual se basa en la generación de curvas de fusión generadas con pequeños incrementos de temperatura, los cuales permiten distinguir fragmentos de ADN que difieren en los nucleótidos. Algunos patógenos identificados y reportados mediante esta técnica son *Monilinia* spp. (Papavasileiou et al. 2016), *V. inaequalis* (Chatzidimopoulos et al. 2019), *Fusarium* spp. (Schiwek et al. 2020), *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp., *M. phaseolina* (Ratti et al. 2019; Wang et al. 2021), *Neopestalotiopsis* spp. (Rebello et al. 2022) (artículo en revisión). Esta técnica se lleva a cabo dentro del termociclador en tiempo real (Schiwek et al. 2020).

Por otro lado, la identificación morfológica de especies similares a *Pestalotiopsis*, acuerdo con Maharachchikumbura et al. (2014), se basa en el color de la colonia, número de células, número de apéndices y mediciones, largo y ancho, además, velocidad del crecimiento. La identificación morfológica y molecular son piezas complementarias fundamentales para la identificación de géneros y especies de este patógeno, reportándose en algunos países y considerándose como nuevo problema o problema emergente. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue realizar la identificación molecular y determinar las características morfológicas de aislamientos de *Neopestalotiopsis* spp. aisladas de diferentes órganos de las plantas de fresa y su variabilidad patogénica. Así como determinar la respuesta de once variedades de fresa a la inoculación de *N. rosae*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Recolección y aislamiento de muestras

Se realizaron colectas en Michoacán, Guanajuato, Estado de México y plantas provenientes de Puebla, en la temporada 2020 en el mes de octubre-noviembre en 60 ranchos. Las muestras se colectaron de síntomas típicos de los diferentes órganos de las plantas (e.g hoja, peciolo, raíz, corona). Se obtuvieron un total de 498 aislamientos de los cuales se seleccionó un primer subconjunto de 160 aislamientos con base a diversas características como superficie de la zona colectada, variedades, origen, proveedor, órgano y diferencias morfológicas. De este subconjunto se identificaron mediante la técnica High-Resolution Melting (HRM). Con los resultados obtenidos mediante la técnica HRM se realizó otro subconjunto de 29 aislamientos basados en diversas características (Cuadro 1). Esto con la finalidad de determinar la variabilidad patogénica e identificación morfológica. La purificación, identificación morfológica y pruebas de patogenicidad, se realizaron en el Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo. La identificación rápida por el método HRM se realizó en la Universidad de Florida en el Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo.

Se procesaron tejidos sintomáticos y asintomáticos de cada una de las plantas, (peciolos, estolones, manchas foliares, corona y raíz) (Fig. 1). Los tejidos de las plantas se desinfestaron superficialmente en una suspensión de NaClO_3 al 2% por 2 minutos, después se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, posteriormente se secaron sobre sanitas esterilizadas durante 25 min. Finalmente se realizaron cortes de tejidos dañados y se colocaron en cajas Petri con medio agar dextrosa papa (PDA) (BIOXON™). Las cajas petri se mantuvieron a temperatura de laboratorio ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) hasta su crecimiento y formación de acervulos, con la finalidad de continuar con la obtención de aislamientos monospóricos. Además, los tejidos fueron incubados, en cámaras húmedas a la misma temperatura para su esporulación (Rebollar-Alviter et al. 2020).

Cuadro 1. Aislamientos obtenidos de plantas de fresa utilizados para la identificación morfológica y molecular de *Neopestalotiopsis* spp.

No	Aislado	Municipio	Coordenadas		Variedad	Cepellón/raíz desnuda	Órgano
			Lat N	Long W			
1	CRM-C1	Jacona	19.9589	102.2877	Palmeritas	Cepellón	Corona
2	CRM-C2	Jacona	19.9519	102.2745	Frontera	Raíz desnuda	Corona
3	CRM-C3	Tangancícuaro	19.8748	102.1648	San Andrea	Raíz desnuda	Corona
4	CRM-C4	Zamora	19.8748	102.1648	Fortuna	Raíz desnuda	Corona
5	CRM-R5	Zamora	19.9941	102.3368	Fortuna	Cepellón	Raíz
6	CRM-C6	Cerritos	19.9675	102.3143	Fortuna	Raíz desnuda	Corona
7	CRM-R7	Cerritos	19.9613	102.3322	Fortuna	Cepellón	Raíz
8	CRM-H8	Maravatío	20.0372	100.5222	Albión	Raíz desnuda	Hoja
9	CRM-C9	Maravatío	19.9604	100.4751	Camino Real	cepellón	Raíz
10	CRM-C10	Tarandacuao	20.0292	100.5419	Monterrey	Raíz desnuda	Corona
11	CRM-P11	Tarandacuao	20.0147	100.5301	Cabrillo	Raíz desnuda	Pedúnculo
12	CRM-R12	Tarandacuao	20.0379	100.5244	14-90	Desconocido	Hoja
13	CRM-R13	Tziritzicuaro	19.9567	100.4829	Sayulita	Cepellón	Corona
14	CRM-H14	Tziritzicuaro	19.9604	100.4751	Albion	Raíz desnuda	Hoja

Continuación....

No	Aislado	Municipio	Coordenadas		Variedad	Cepellón/raíz desnuda	Órgano
			Lat N	Long W			
15	CRM-H15	Queréndaro	19.8105	100.9163	Cabrillo	Cepellón	Hoja
16	CRM-P16	Queréndaro	19.8127	100.9072	Cabrillo	Cepellón	Pedúnculo
17	CRM-E17	Zinapécuaro	19.8375	100.8263	Cabrillo	Raíz desnuda	Estolón
18	CRM-C18	Zinapécuaro	19.8375	100.8405	Cabrillo	Raíz desnuda	Corona
19	CRM-C19	Edo. México	18.8486	99.6211	Albion	Raíz desnuda	Corona
20	CRM-R20	Edo. México	18.8469	99.6219	Camino Real	Raíz desnuda	Raíz
21	CRM-H21	Pátzcuaro	19.3891	101.3755	Albion	Raíz desnuda	Hoja
22	CRM-R22	Pátzcuaro	19.5375	101.3813	Sayulita	Raíz desnuda	Raíz
23	CRM-H23	Irapuato	20.0291	100.4693	Camino Real	Raíz desnuda	Corona
24	CRM-R24	Irapuato	20.5953	101.4151	Camino Real	Raíz desnuda	Hoja
25	CRM-H25	Jerécuaro	20.0291	100.4693	Albion	Raíz desnuda	Hoja
26	CRM-H26	Jerécuaro	20.5953	101.4151	Albion	Raíz desnuda	Hoja
27	CRM-C27	Abasolo	20.5660	101.5041	Fortuna	Raíz desnuda	Hoja
28	CRM-H28	Abasolo	20.5660	101.5041	Fortuna	Raíz desnuda	Corona
29	CRM-R29	León gto	20.9368	101.6513	San Andrea	Cepellón	Corona

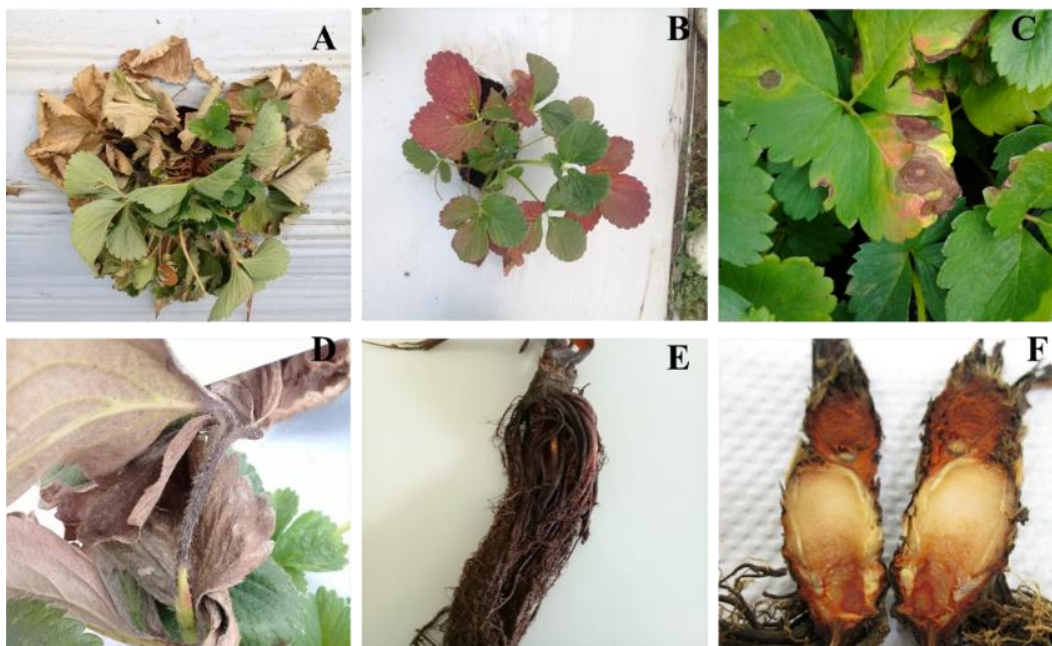


Figura 1. Síntomas en diferentes partes de la planta de fresa. A) Marchitamiento de la planta con inicio de la parte externa hacia la parte interna del follaje; B) Coloración rojiza de follaje y nervaduras verdes; C) Manchas foliares; D) Peciolo necrosado; E) Raíz necrótica; F) Parte interna de la corona con coloración marrón aperlado.

2.2.2. Obtención de aislamientos monoconidiales

Los aislamientos obtenidos se pusieron a crecer en medio agar PDA a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ hasta la formación de acérvulos, se realizaron cortes con un sacabocados de 5 mm y se colocaron en tubos de ensaye con 9 ml de agua destilada esterilizada, se agitaron en un vortex (Analog Vortex Mixer Modelo No.945300) y se colocaron 4 gotas de la suspensión en un medio poco nutritivo (agua agar, AA), estas gotas se colocaron a manera de que escurrieran en el medio sin tocarse, para facilitar la extracción del conidio germinado. Posteriormente se incubaron durante 24 horas a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ después se revisó la germinación de los conidios en un microscopio Carl Zeiss (Modelo Primo Star, Alemania) y se extrajo un solo conidio germinado, el que se transfirió a medio PDA para la obtención de cultivos monoconidiales.

2.2.3. Pruebas de patogenicidad

Para realizar las pruebas de patogenicidad se utilizaron hojas desprendidas totalmente expandidas de fresa de la variedad Fortuna (vivero GreenSam de Jacona, Michoacán), con estado de madurez intermedio. Las pruebas se llevaron a cabo en laboratorio utilizando 29 cultivos monoconidiales.

El inóculo se obtuvo de cultivos monoconidiales, se incrementó en medio de cultivo PDA y se incubaron a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ con 12 horas luz y 12 horas oscuridad hasta que formaron acérvulos, posteriormente se raspó el crecimiento utilizando una aguja de disección esterilizada, adicionando agua destilada estéril. La suspensión conidial obtenida se filtró por medio de gasas, para eliminar segmentos de micelio. La concentración de la suspensión de conidios se determinó con la ayuda de un hematocitómetro (Marienfeld, Alemania, No. 0630010) y se ajustó a 1×10^5 conidios ml con agua destilada esterilizada.

Para determinar la patogenicidad de cada aislamiento se usaron 5 hojas, y el experimento se repitió dos veces. Las inoculaciones se realizaron en todos los casos en cámaras húmedas, que consistieron en chaloras de plástico de 28cm x 17cm. Posteriormente, se mantuvieron a temperatura de laboratorio $22 \pm 2^\circ \text{C}$ hasta que el 70 % de las hojas se encontró afectada en su totalidad. Las hojas se inocularon en 4 puntos y uno en el centro colocando 5 gotas de 10µl de la suspensión previamente ajustada a 1×10^5 .

Adicionalmente, se evaluó la respuesta de 11 variedades de fresa con uno de los aislamientos más virulento. Estas variedades fueron: Fortuna, Albion, Camino Real, Festival, Frontera, Marisol, Palmeritas, Rociera, San Andrea, Sensation y Shyra. En este caso para la inoculación se utilizaron nueve hojas en cada experimento, siguiendo los mismos procedimientos que en la determinación de la variabilidad patogénica.

En cada experimento, se determinó el Periodo de incubación ($\text{Sin}=\text{Pi}$), tiempo en el que cubrió por completo el daño la lámina foliar (Lf) y diámetro final de la mancha (Pdmf).

2.2.4. Caracterización morfológica y cultural de *Neopestalotiopsis* spp.

Se evaluó el diámetro del crecimiento final de la colonia ($T_c=D_c$) de los 29 aislamientos a los 8 días, colocando un disco de 5mm de diámetro en el centro de la caja Petri con medio PDA. Las placas se incubaron a 22 ± 2 °C, después se midió el diámetro en dos líneas para determinar el crecimiento. Por otro lado, el color de la colonia se evaluó por la parte del frente y el revés de la caja Petri. Así mismo, producción de micelio, textura, elevación, márgenes y producción de acérvulos (Fig. 2).

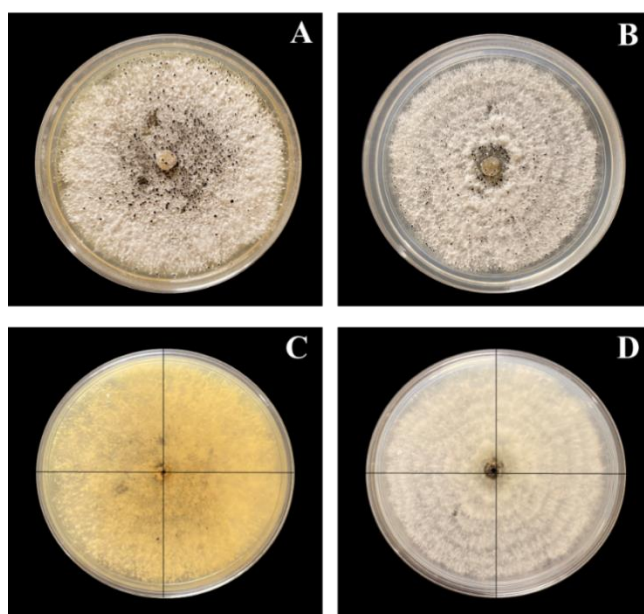


Figura 2. Morfología de la colonia. A y B) Vista frontal de la colonia; C y D) Vista del reverso de la colonia.

Para la caracterización morfológica conidial se utilizaron cajas Petri con medio PDA y se rasparon los acérvulos para la liberación de los conidios. Algunos aislamientos no produjeron acérvulos en medio PDA. Por lo que, se pusieron a crecer en medio pino agar-agar (PNA) el cual consta de agar pobre en nutrientes sobre el que se colocaron acículas de pino (Crous et al. 2009). Se hizo una preparación utilizando un portaobjetos el cual se visualizó en un microscopio y se tomaron fotografías de 100 conidios para la medición (largo y ancho) utilizando una cámara de microscopio

(Axiocam 200) así mismo, se determinó el número de células y número de apéndices (Fig. 3).

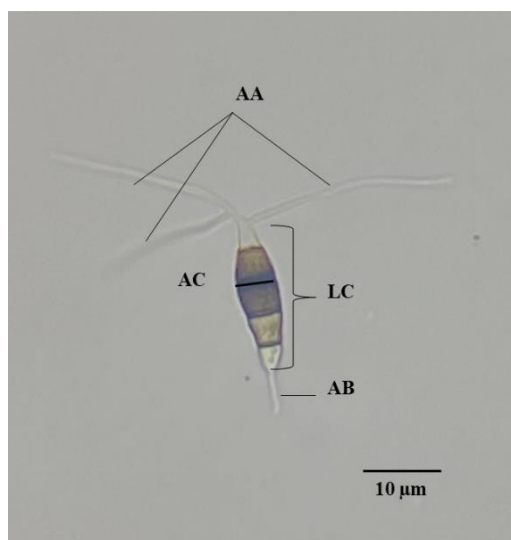


Figura 3. Morfología conidial. AA: Apéndices apicales; LC: Largo del conidio; AC: Ancho del conidio; AB: Apéndice basal.

2.2.5. Identificación de aislamientos mediante High Resolution Melting

Se realizó la extracción de ADN de 160 cultivos monoconidiales, los cuales se activaron en medio de cultivo V8. La extracción se realizó en el Centro Regional Universitario Centro Occidente-Morelia (CRUCO-UACH). El micelio de los cultivos fúngicos en crecimiento se raspó de la superficie de la caja Petri utilizando una aguja de siembra esterilizada, posteriormente se realizó la extracción de ADN mediante el método del CTAB 2% (Freeman et al. 2001; Fuentes-Aragon et al. 2018). La concentración del ADN se determinó mediante espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) en el Colegio de Postgraduados (COLPOS), se consideró un ADN de buena calidad cuando las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ se encontraron entre 1.7 y 2.1. Posteriormente las muestras de ADN se identificaron mediante la técnica HRM en el Centro de Investigación y Educación de la Costa del Golfo de la Universidad de Florida (GCREC – UF). Para ello las muestras de ADN total se diluyeron a 10 ng/µl, de aquí se utilizó solo 1 µl para la prueba HRM (Wang et al. 2021; Rebello et al. 2022).

Para la identificación mediante HRM se utilizaron dos pares de iniciadores diseñados por Exprefeso por la Universidad de Florida para la identificación de *Neopestalotiopsis* spp. basados en la secuencia parcial del gen beta-tubulina (β -tub).

Neo_Tub2_A1F(5'-CGACAGCAATGGAGTGTATGTACTA-3')

Neo_Tub2_A1R(5'-CCATCGAGTCAGCCTACAAGC-3')

Neo_Tub2_B1F(5'-GTCTACTTCAACGAGGCTTCCG-3')

Neo_Tub2_B1R(5'-CGACGAGGACGGCACGA-3')

Estos iniciadores se sometieron a análisis de ADN genómico mixto con la finalidad de observar picos de fusión distintos entre *Neopestalotiopsis* spp. Para detectar ADN genómico mixto y su impacto en el patrón de las curvas de fusión generadas por el análisis HRM, se utilizaron combinaciones de ADNg a 10 ng/ μ l de *Neopestalotiopsis* sp. y *N. rosae* (aislamiento de México). Los 160 aislamientos de esta investigación se prepararon en una proporción de 1:1. Se utilizaron las siguientes condiciones para PCR comenzando con una desnaturalización inicial de 95°C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de 95°C durante 20 s, 60°C durante 30 s y 72° durante 20 s. Para HRM los parámetros fueron: 95°C durante 1 min, 40°C durante 1 min, 65°C por 1 s y una lectura de fluorescencia continua de 65 a 95°C, con un paso de enfriamiento final de 40°C por 30 s. Se incluyó agua grado biología molecular (Thermo Fisher Scientific) como control. El experimento se realizó dos veces (Wang et al. 2021; Rebello et al. 2022). Para el análisis HRM los productos de PCR fueron sometidos en el software LightCycler 480 (versión 1.5.162) (Roche diagnostics).

2.2.6. Análisis de datos

Con las variables registradas para determinar la variabilidad patogénica se construyeron distribuciones que se ilustraron mediante histogramas. Posteriormente, con las variables cuantitativas, se realizó un análisis de componentes principales, a fin de conocer las variables y los aislamientos que más contribuyeron a la variación de los datos. Finalmente, se realizó un análisis de

conglomerados, para conocer en agrupamientos de los aislamientos con base en estas variables. Todos los análisis se realizaron mediante el software R (Core Team) usando la librería FactoMner y Factoshine (Lê et al. 2008). La respuesta de las variedades a la inoculación de *N. rosae*, se realizó mediante un Análisis de varianza con el software SAS y el procedimiento Glimmix (Generalized Linear Mixed Models). Posteriormente se realizó la comparación de medias (LSD, $p=0.05$) de la severidad al final del experimento.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Variabilidad patogénica y análisis de componentes principales

Todos los aislamientos inoculados en las hojas, independientemente del origen, fueron patogénicos. La figura 4; muestra la distribución de las variables lamina foliar afectada totalmente (Lf), diámetro de la mancha final (Pdmf), el diámetro final del crecimiento de los aislamientos (Dc) y el periodo de incubación (Pi). Como se observa, la mayor proporción de los aislados afectaron la Lf total la cual vario de 8 a 10 días representado por el 55% de los aislamientos, por lo que el 13 % duro 14 días en afectar la Lf total (Fig. 4A). En cuanto al Pdmf la proporción de aislamientos evidenció entre 0.8 y 1.1 cm representado por el 89% de los aislamientos (Fig. 4B). La proporción de los aislamientos en el Dc final de la colonia se encontró entre 7.0 a 7.5 cm representado por el 58% de los aislamientos y solo el 10.3% tuvo un Dc de 8.0 cm (Fig. 4C). Por lo que, el 55% de los aislados tuvieron un Pi de 24 h, por lo que, el 22% presentó un Pi de 48 h, siendo el 13% de los asilamientos los que presentaron un Pi de 72 h y solo el 10% un Pi de 12 h, (Fig. 4D). Sin embargo, hubo diferentes grados de virulencia, aunque los síntomas fueron similares a los que ocurren en condiciones naturales. Así mismo, hubo variación en cuanto al daño total de la Lf representado en días después de la inoculación (DDI), hubo aislamientos que presentaron síntomas iniciales en primera instancia, la velocidad con la que cubrieron Lf fue diferente esto se refleja en el análisis de componentes principales (Fig. 5A y B).

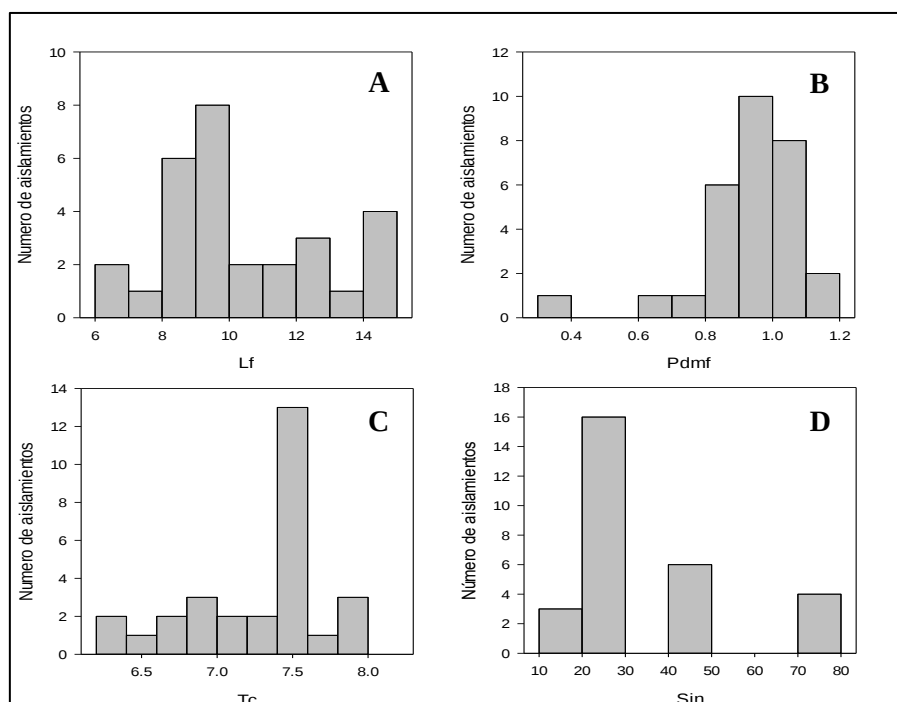


Figura 4. Distribución de las variables. Lamina foliar afectada (Lf) Diámetro del crecimiento final (Tc=Dc), diámetro de la mancha final (pdmf), periodo de incubación (Sin=Pi) en la fresa variedad Fortuna.

Cuando los datos se analizaron de manera conjunta mediante un análisis de componente principales, los resultados indicaron que la variable órgano (Org) explicó la variación que existe entre cada aislamiento (Fig. 5A). Por lo que, los aislamientos 4, 19, 29, 2 y 21 los cuales se encuentran a la derecha de la gráfica en el primer componente tienen un efecto fuertemente positivo en el eje horizontal, lo que indica estadísticamente que son los aislamientos que contribuyeron más a la variación. Dichos aislamientos fueron aislados de corona a excepción del aislamiento 21 que fue de hoja. Además, los aislamientos 4 y 29 corresponden a la variedad San Andrea, y los aislamientos 19 y 21 a la variedad Albion, el aislamiento 2 fue obtenido de la variedad Frontera, de igual manera, la mayoría son de plantas provenientes de raíz desnuda a excepción del aislamiento 29. El origen para cada uno de los aislamientos es diferente perteneciendo a Zamora, Estado de México, León, Jacon y Pátzcuaro. Estos aislamientos, además presentaron valores elevados en el Pi y en Lf. Por lo que, el periodo en presentar los síntomas iniciales

fue alrededor de las 48-72 HDI y de 12 a 14 días en cubrir el daño en un 100 % de la Lf. Estas variables están fuertemente correlacionadas ya que entre más rápido presentaron síntomas, más Lf dañada se manifestó (Fig. 5B). También fueron los aislamientos que presentaron menor Dc al día 8 y menor Pdmf en las pruebas de patogenicidad ya que hubo crecimientos irregulares hacia el centro de la hoja formándose un atizonamiento, no permitiendo continuar con la medición.

Otro grupo de aislamientos como 13, 16, 14, 24 y 10 tuvieron un efecto fuertemente negativo en el eje vertical los cuales contribuyeron menos en la variación, (Fig. 5A). Estos aislamientos fueron aislados de corona, hoja y peciolo, así como, de diversas variedades como Sayulita, Cabrillo, Albion, Camino Real y Monterrey, correspondientes a las zonas de Maravatío (Tziritzicuaro-Tarandacua), Queréndaro e Irapuato. Este grupo de aislamientos presentó valores altos del Pdmf con un promedio 1.04 dm y valores bajos en el Lf con un promedio de 7-8 días. Lo que indica que estos aislamientos fueron los más virulentos. Además, el Pi fue entre 12 y 24 HDI dichos parámetros se encuentran correlacionados, ya que son las variables de mayor valor descriptivo (Fig. 5B). Por lo tanto, se puede inferir que el Pi y el Lf total de los aislamientos, puede ser similar aun siendo aislados de diferentes órganos de acuerdo con este grupo de aislamientos.

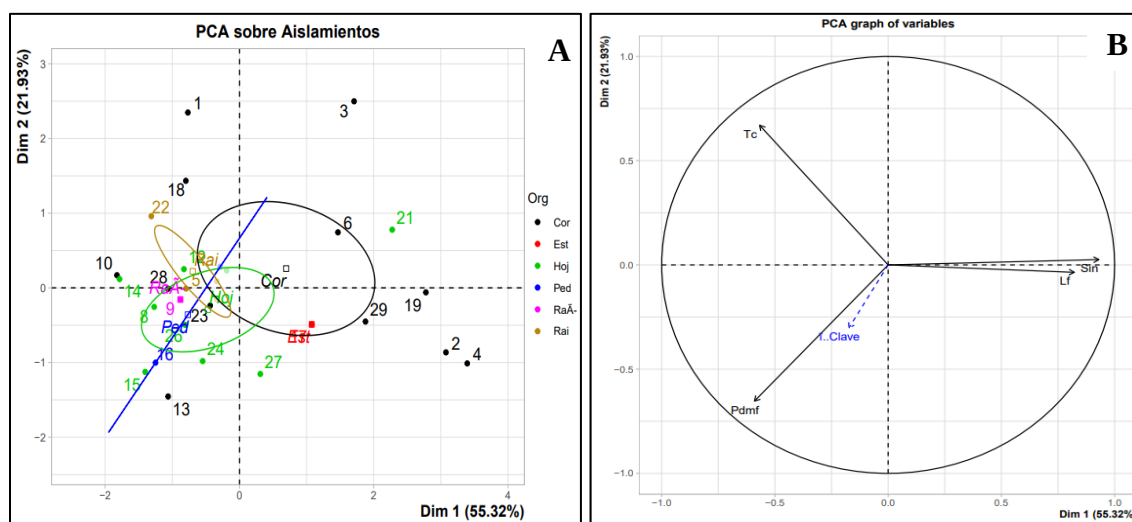


Figura 5. Análisis de componentes principales A) Mapa factorial de aislamientos; B) Mapa de correlación de variables. Sin=Pi= Periodo de incubación; Lf= lamina foliar dañada representada en días; Tc=Dc= crecimiento del aislamiento al día 8; Pdmf= Diámetro de la mancha final.

El análisis de conglomerados resultó en 6 conglomerados muy definidos (Fig. 6). En el primer conglomerado (Negro), se agrupan 7 de los 29 aislamientos evaluados los cuales tienen una relación en los criterios evaluados, donde los síntomas iniciales estuvieron entre las 12 y 24 HDI, es decir fueron los aislamientos que más rápido presentaron los síntomas, además, fueron los que más rápido afectaron la Lf total en un rango de 6 a 10 DDI. Por lo tanto, fueron los aislamientos que mayor Pdmf evidenciaron. Estos, son aislamientos con origen de la zona de Maravatío (Tziritzicuaro-Tarandacuao), Queréndaro, Irapuato y Abasolo. En el segundo conglomerado (Verde) se agrupan 11 de los 29 aislamientos, los cuales resultaron con similitud en presentar síntomas iniciales en un rango de 24-48 HDI, la Lf afectada en su totalidad fue de 8-12 DDI, y con un promedio del Dc de 1 cm. El diámetro del crecimiento al día ocho de estos aislamientos, se encontró entre 7.25-7.65 cm. En cuanto a las variedades involucradas en este grupo de aislamientos se encuentran Albion, Fortuna, Cabrillo y Camino Real, en su mayoría corresponden a plantas de raíz desnuda. En cuanto al origen se encuentra muy variado. En el tercer conglomerado (Rosa), se agrupan los aislamientos 1, 2 y 18, los cuales tienen una relación en el Pi de 24 h y un crecimiento de 8 cm, con daños en la Lf total entre 8-10 días. En el cuarto conglomerado (Azul), se incluye solo el aislamiento 3, el cual su origen es de Tangancícuaro, los síntomas iniciales en las pruebas de patogenicidad los presentó 48 HDI, se considera como un aislamiento de crecimiento rápido con 7.10 cm, en 8 días logra afectar por completo la Lf y el Pdmf fue de 0.38 cm aparentemente es un valor bajo sin embargo, cabe mencionar que las manchas se alcanzaron a unir formando un atizonamiento por lo que, el Dc fue rápido, este aislamiento se obtuvo de la variedad San Andrea, de la parte interna de la corona. En el quinto conglomerado (Morado) se encuentran los aislamientos 2 y 4 de la zona de Jacona y Zamora y de las variedades Frontera y Fortuna aislados de corona, ambos de raíz desnuda, presentando similitudes en el Dc siendo de los aislamientos que duraron más en mostrar síntomas 72 HDI, dañando la Lf en su totalidad de 12-14 días. En el sexto conglomerado (Azul celeste), se encuentran 5 aislamientos, los cuales presentaron valores intermedios en el Dc, duraron de 48-

72 h en presentar síntomas, y de 12-14 días en dañar la Lf y tuvieron un promedio de 0.87 cm en el Pdmf, en su mayoría son provenientes de plantas de raíz desnuda a excepción del aislamiento 29.

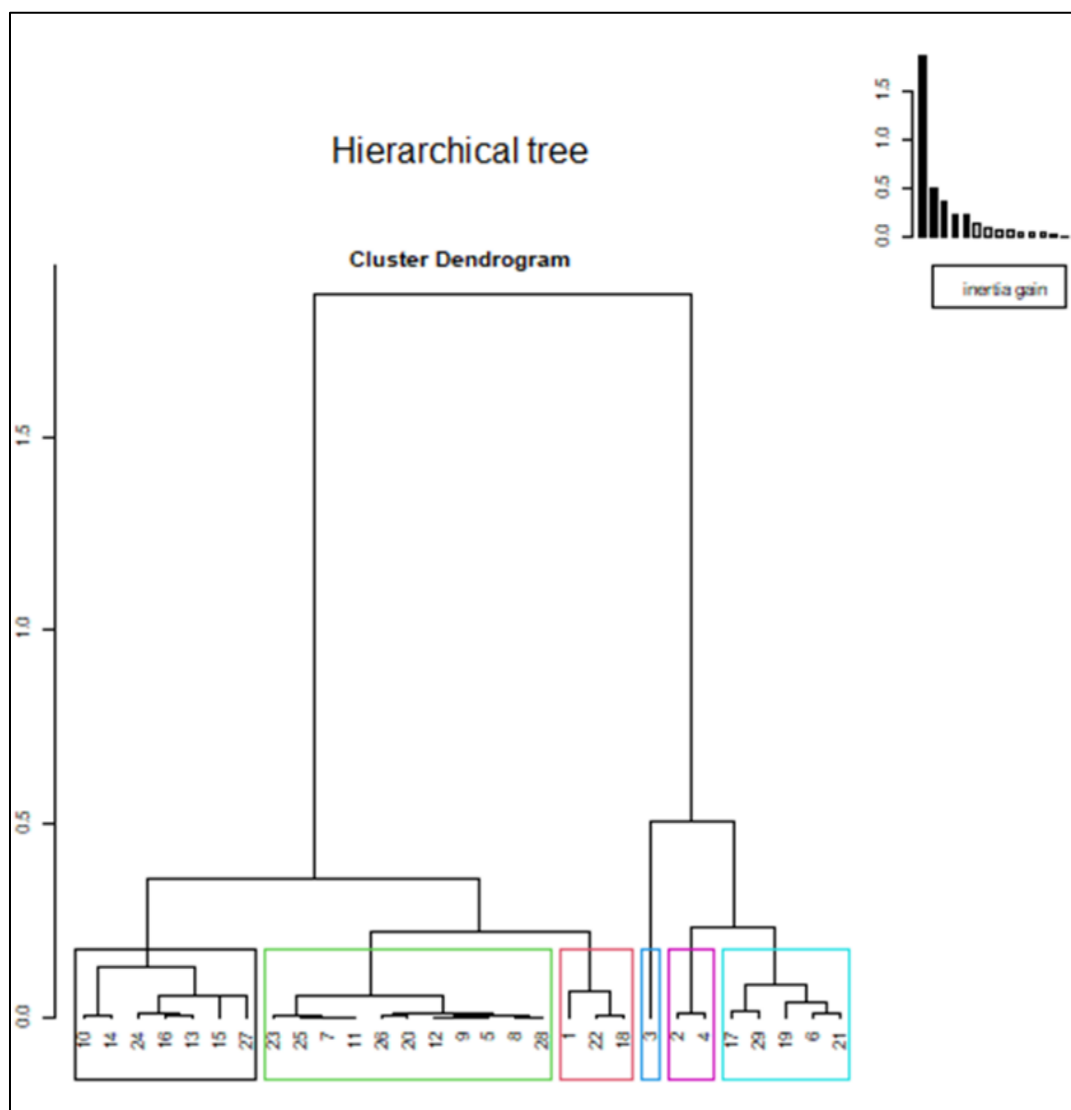


Figura 6. Análisis por conglomerados de aislamientos de *Neopestalotiopsis* sp. en base a Periodo de incubación ($Sin=Pi$), velocidad del crecimiento ($Tc=Dc$), Lamina foliar dañada (Lf) y diámetro final de la mancha (Pdmf).

2.3.2. Respuesta de 11 variedades a la inoculación de *N. rosae*

Los resultados de las pruebas de patogenicidad de las variedades presentan diferencia significativa ($P < 0.0001$; $F=14.44$), dentro de la variable severidad lo que

indica que hubo variedades con nivel de susceptibilidad a *N. rosae* (Fig. 7A). La variedad Marisol fue la que presentó menor susceptibilidad mostrando diferencias significativas con todas las variables, sin embargo, el Pi no fue el más largo para esta variedad a pesar de que fue la menos susceptible (Fig. 7B), pero si fue la que menos diámetro de las 5 manchas evaluadas evidenció (Fig. 7C). En cuanto a la Lf dañada hubo diferencias significativas ($P < 0.0148$; $F = 2.30$) entre variedades. Por lo que, la variedad Marisol se vio afectada dentro de los 10 DDI (Fig. 7D). Le siguen las variedades San Andrea, Rociera y Shyra sin diferencias significativas entre ellas. Además, presentaron un Pi aún más extenso, siendo San Andrea la que evidenció el Pi más largo, lo que indica que fue la variedad que duro más en presentar los síntomas iniciales (Fig. 7B). En cuanto al diámetro de la macha no hubo diferencias significativas a excepción de Rociera que fue la que presentó mayor Pdmf mostrando diferencias significativas con todas las variedades (Fig. 7C). Sin embargo, estas variedades fueron las que tardaron más en que la Lf fuera dañada por completo (Fig. 7D). Enseguida la severidad que presentó Palmeritas no fue diferente significativamente con la severidad de Camino Real, Sensation, ni con las variedades anteriores, tampoco hubo diferencias significativas con Festival y Frontera (Fig. 7A). En el Pi estas variedades presentaron similitudes al inicio de los primeros síntomas a excepción de la variedad Frontera y tardó más a diferencia de Festival donde el Pi de *N. rosae* fue menor, dichas variedades no presentaron diferencias significativas en el Pdmf (Fig. 7C). Por lo que, las variedades Albión y Fortuna presentaron mayor porcentaje de severidad que las variedades anteriores, sin embargo, quien presentó los valores más altos de severidad fue Fortuna en un 100% (Fig. 7A). Así mismo, el Pi del patógeno fue menor por lo que, los síntomas iniciales se manifestaron primero que en las demás variedades. El Pdmf evaluada no presentó diferencias significativas con las variedades mencionadas anteriormente. Además, fue la variedad donde más rápido se vio afectada la Lf.

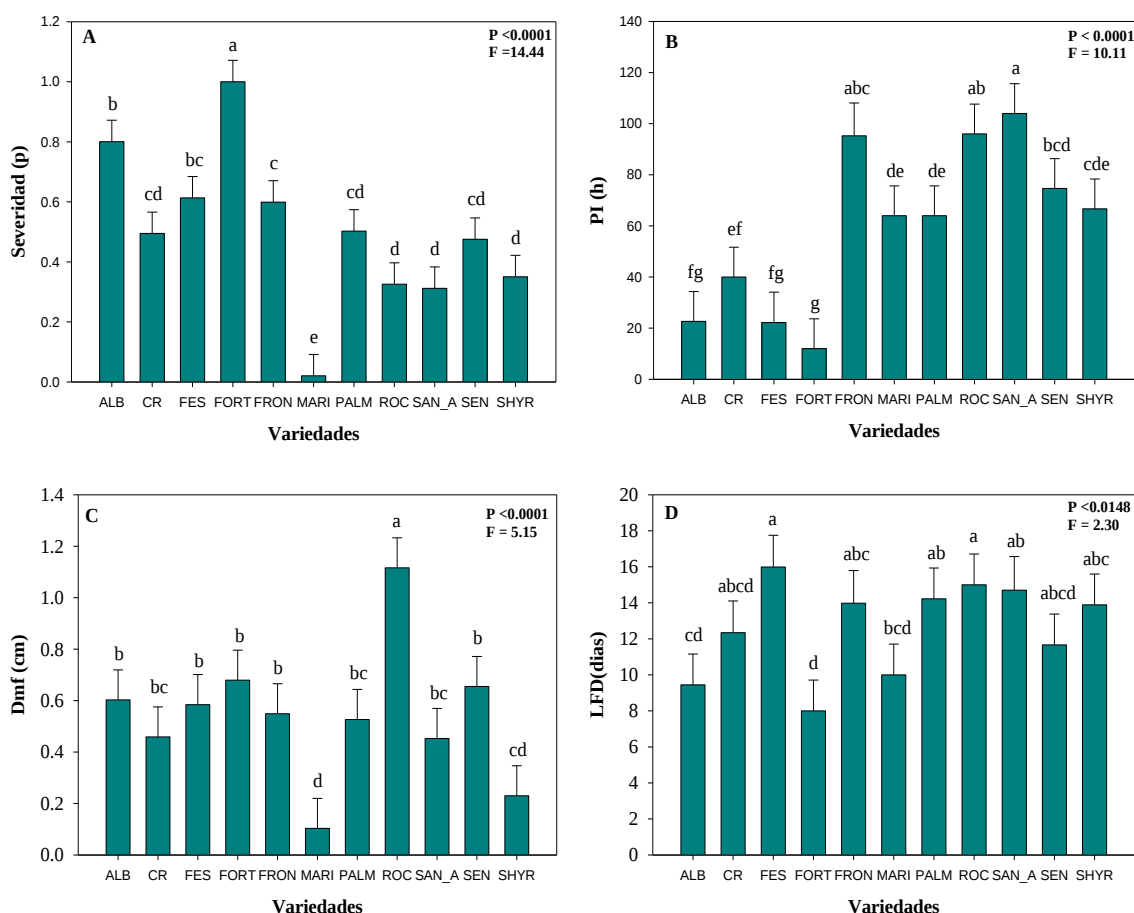


Figura 7. Susceptibilidad de variedades de fresa a *N. rosae*. A) Severidad; B) Periodo de incubación; C) Diámetro final de la macha; D) Daño total de la lámina foliar. ALB= Albion, CR= Camino Real, FES= Festival, FORT= Fortuna, FRON= Frontera, MARI= Marisol, PALM= Palmeritas, ROC= Rociera, SAN_A= San Andrea, SEN= Sensation, SHYR= Shyra.

2.3.3. Caracterización morfológica de los aislamientos

De los 29 aislamientos obtenidos se determinaron 8 grupos morfológicos con base en las características de la colonia como se describen a continuación:

Grupo morfológico 1. Colonia de color blanco por la parte frontal, producción intermedia de micelio, textura motosa, márgenes concéntricos, producción de acérvulos intermedia, el reverso de la colonia de color blanco. A este grupo corresponde el aislamiento 13 (Fig. 8).

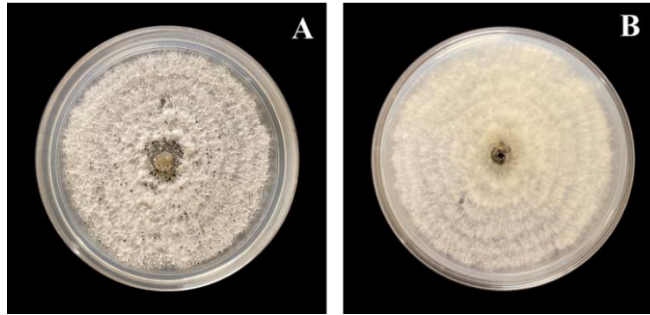


Figura 8. Grupo morfológico 1. Aislamiento 13 de 11 días de crecimiento A) vista frontal; B) Reverso de la colonia.

Grupo morfológico 2. Colonia de color grisáceo por la parte frontal, producción de micelio bajo, textura ligeramente motosa a lisa márgenes concéntricos, producción de acérvulos intermedio y agrupados hacia un lado, reverso de la colonia de color blanco a grisáceo. A este grupo corresponde el aislamiento 4 (Fig. 9).

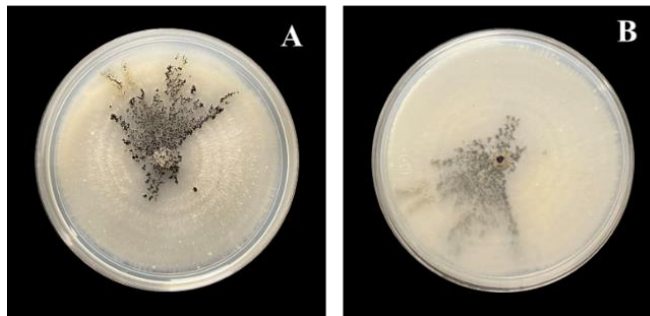


Figura 9. Grupo morfológico 2. Aislamiento 4 de 12 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia.

Grupo morfológico 3. Colonia de color blanco y amarillo oscuro por la parte frontal, producción de micelio bajo, textura ligeramente motosa, márgenes irregulares, producción de acérvulos alto, reverso de la colonia de color amarillo opaco a gris. A este grupo corresponde el aislamiento 8 (Fig. 10).

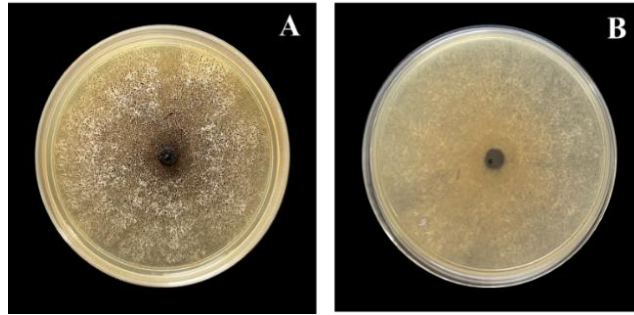


Figura 10. Grupo morfológico 3. Aislamiento 8 de 9 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia.

Grupo morfológico 4. Colonia de color blanco por la parte frontal, producción de micelio intermedio, textura motosa-aterciopelada, márgenes irregulares, producción baja de acérvulos, reverso de la colonia de color blanco con ligero amarillamiento. A este grupo corresponden los aislamientos 25, 27, 21, 9, 3 y 18 (Fig.11).

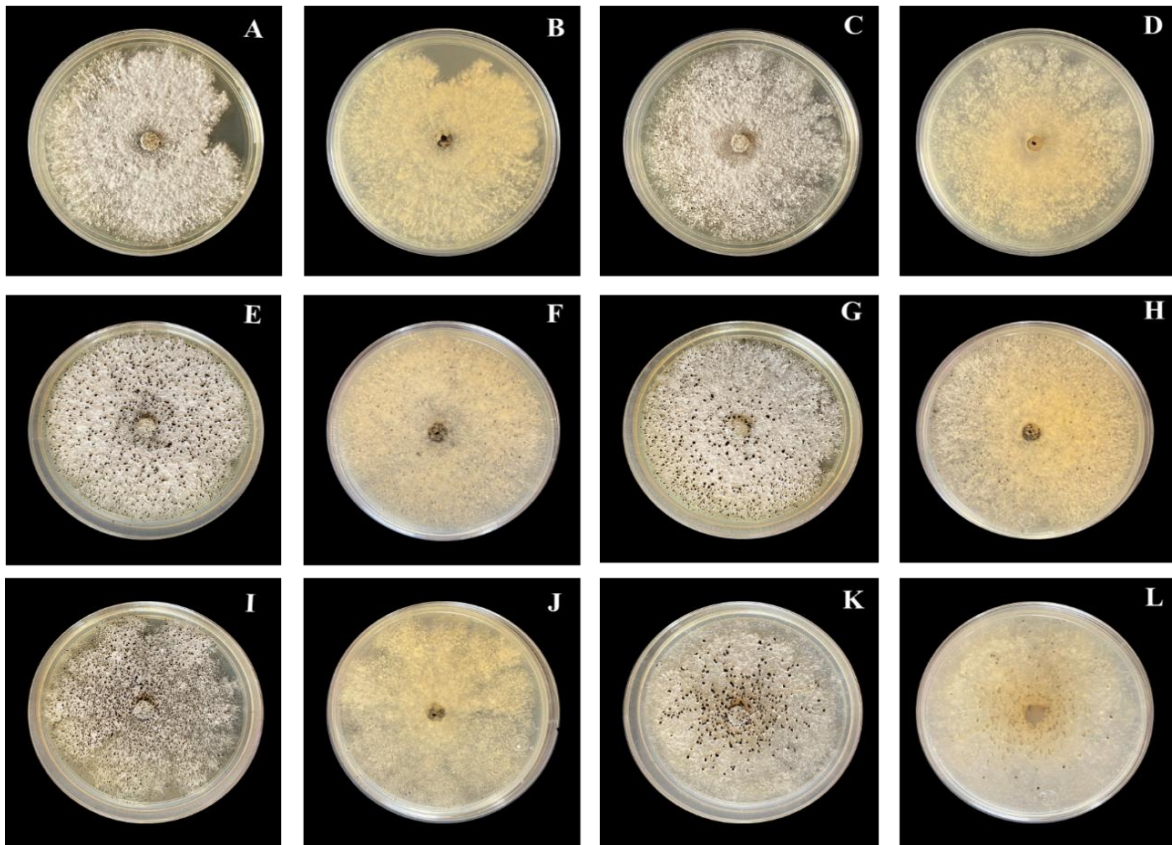


Figura 11. Grupo morfológico 4. Aislamiento 25 de 10 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 27 de 10 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 21 de 9 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 9 de 9 días de crecimiento G) vista

frontal; H) reverso de la colonia; Aislamiento 3 de 9 días de crecimiento I) vista frontal; J) reverso de la colonia; Aislamiento 18 de 8 días de crecimiento K) vista frontal; L) reverso de la colonia.

Grupo morfológico 5. Colonia de color blanco por la parte frontal, producción de micelio intermedio, textura motosa, márgenes irregulares, producción intermedia a baja de acérvulos, reverso de la colonia de color amarillo pálido similar a lo reportado por Maharachchikumbura et al. (2014) para *N. rosae*. A este grupo corresponden los aislamientos 1, 6, 28, 5 (Fig. 12).

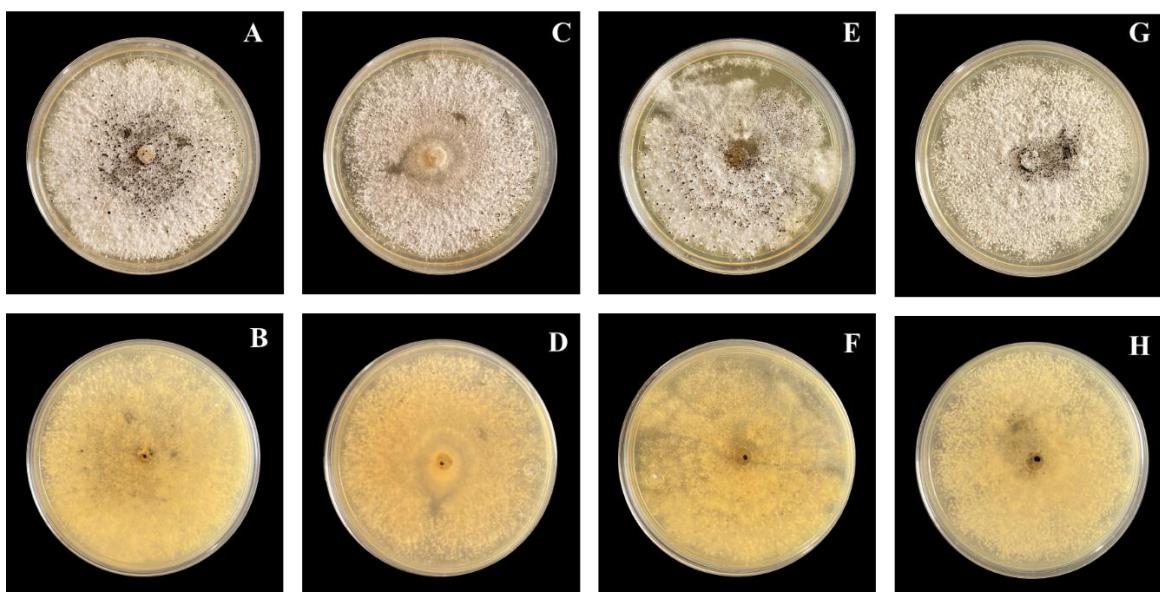


Figura 12. Grupo morfológico 5. Aislamiento 1 de 8 días de crecimiento A) vista frontal B) reverso de la colonia; Aislamiento 6 de 10 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 28 de 11 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 5 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia.

Grupo morfológico 6. Colonia de color blanco por la parte frontal, producción de micelio intermedio, textura motosa, márgenes ligeramente concéntricos a ondulados, producción intermedia a abundante de acérvulos, reverso de la colonia de color amarillo opaco con tendencia a blanco. A este grupo corresponden los aislamientos 7, 12, 14, 20, 19 y 2 (Fig. 13).

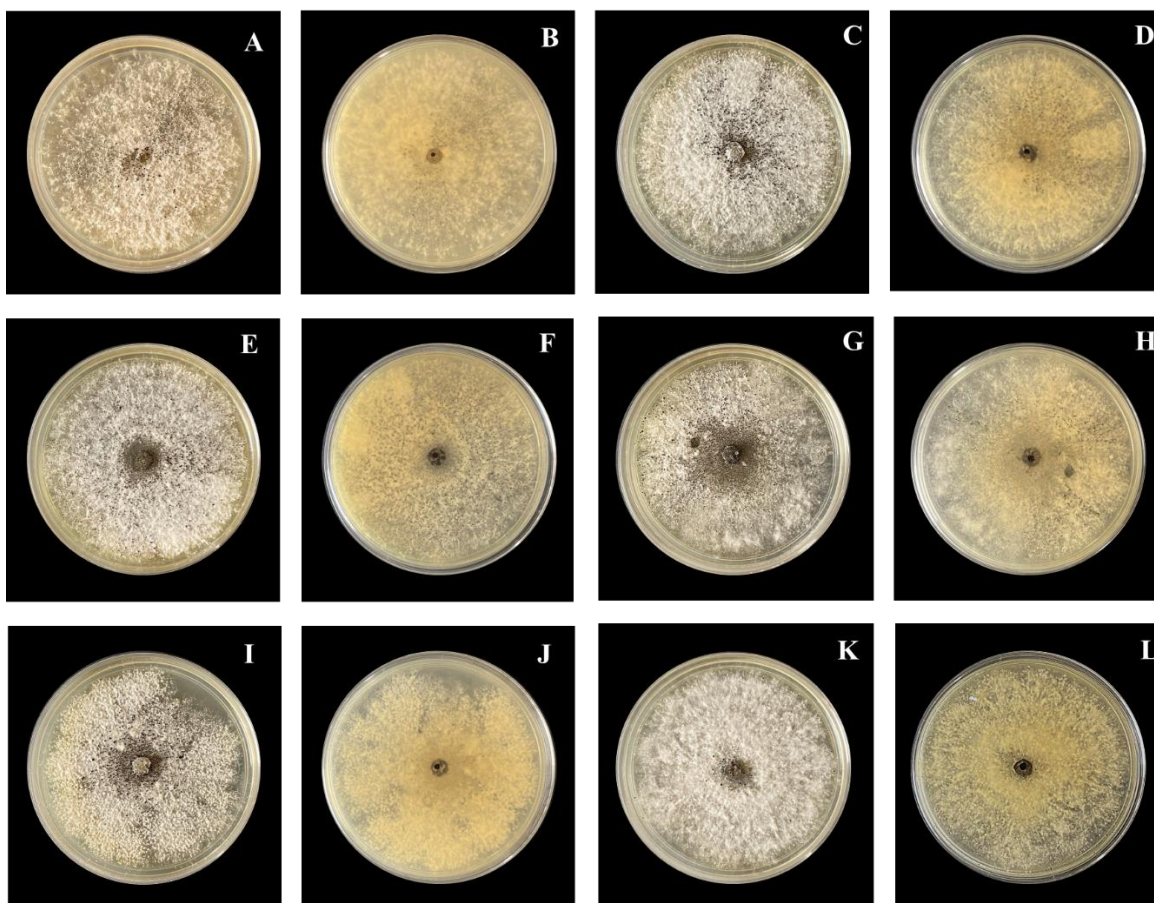


Figura 13. Grupo morfológico 6. Aislamiento 7, de 9 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 12 de 9 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 14 de 9 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 20 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia; Aislamiento 19 de 11 días de crecimiento I) vista frontal; J) reverso de la colonia; Aislamiento 2 de 10 días de crecimiento K) vista frontal; L) reverso de la colonia.

Grupo morfológico 7. Colonia de color blanco por la parte frontal, producción de micelio intermedio, textura aterciopelada, márgenes irregulares, producción intermedia a baja de acérvulos, reverso de la colonia de color amarillo claro. A este grupo corresponden los aislamientos 16, 24, 29, 26, 23 y 22 (Fig. 14).

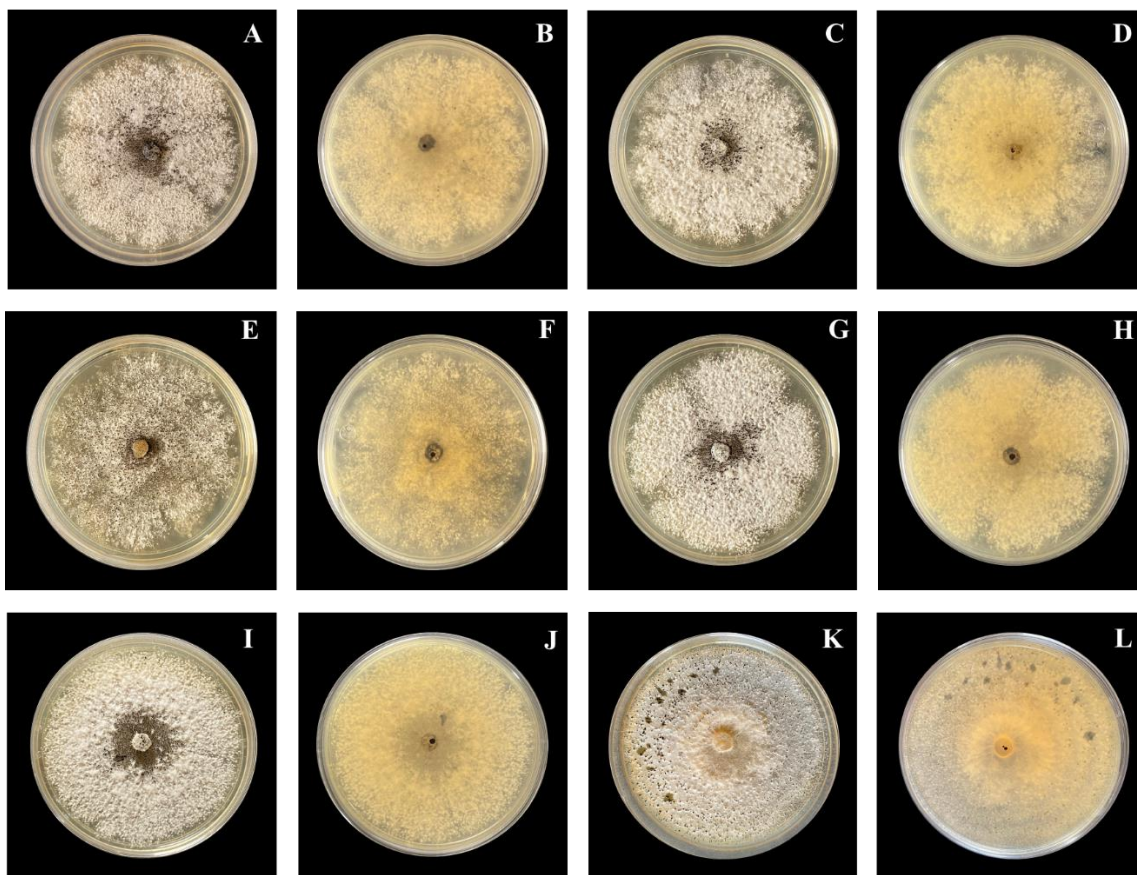


Figura 14. Grupo morfológico 7. Aislamiento 16, de 11 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 24, de 9 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 29, de 10 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 26, de 11 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia; Aislamiento 23, de 9 días de crecimiento I) vista frontal; J) reverso de la colonia; Aislamiento 22 de 8 días de crecimiento K) vista frontal; L) reverso de la colonia.

Grupo morfológico 8. Colonia de color blanco por la parte frontal, producción de micelio intermedio, textura motosa, márgenes irregulares, producción baja de acérvulos, reverso de la colonia de color amarillo-cremoso. A este grupo corresponden los aislamientos 15, 17, 11, 10 (Fig.15).

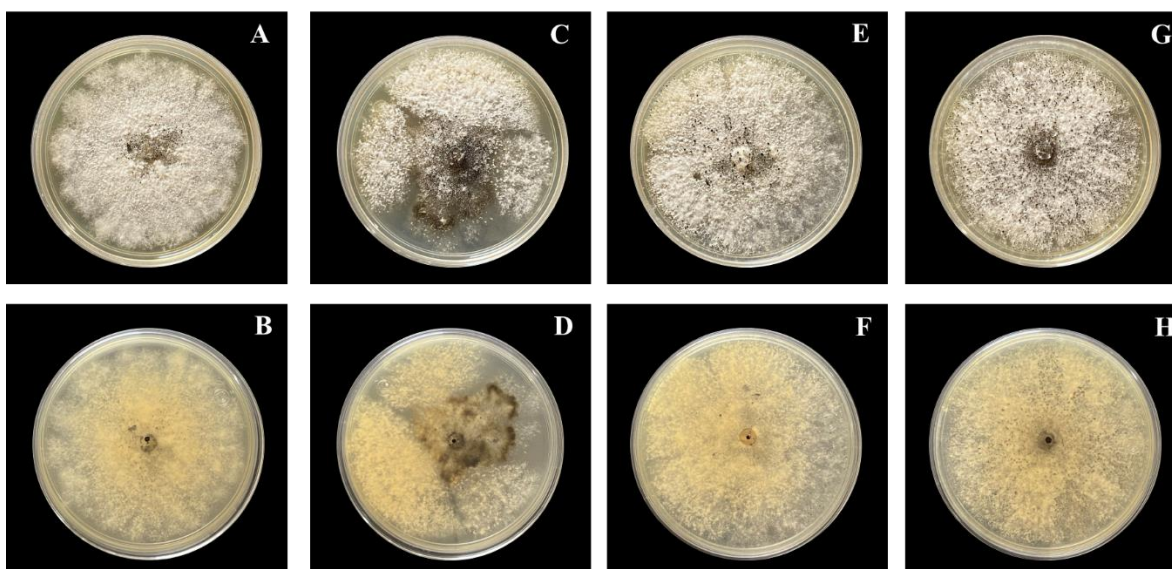


Figura 15. Grupo morfológico 8. Aislamiento 15 de 11 días de crecimiento A) vista frontal; B) reverso de la colonia; Aislamiento 17 de 9 días de crecimiento C) vista frontal; D) reverso de la colonia; Aislamiento 11 de 9 días de crecimiento E) vista frontal; F) reverso de la colonia; Aislamiento 10 de 9 días de crecimiento G) vista frontal; H) reverso de la colonia.

2.3.4. Caracterización morfológica conidial

Los resultados de la caracterización morfológica de los conidios de los 29 aislamientos obtenidos corresponden a *Neopestalotiopsis* spp. Los conidios fueron fusoides a elipsoides en algunos casos ligeramente curvados, presentaron 5 células dos hialinas en los extremos y 3 versicolas en el centro, la segunda célula presentó un color marrón pálido oscureciéndose hacia el septo de la tercera célula, la cual presentó una coloración marrón miel aclarándose hacia la cuarta célula, presentando esta una coloración marrón claro, además los conidios mostraron de 3 a 4 apéndices apicales que surgen de la parte media, alta o baja de la célula apical, en la parte basal solo se presentó un apéndice (Fig. 17). El promedio de la medida de largo y ancho de conidio corresponde a lo reportado por Rebollar-Alviter et al. (2020).

2.3.5. Identificación molecular de aislamientos mediante HRM

Los iniciadores Neo_Tub2_A1F/Neo_Tub2_A1R produjeron un pico de fusión, alrededor de 78.5 °C específico para *N. rosae*, sin embargo, se produjo otro pico de fusión alrededor de 79.5 °C que representa a *Neopestalotiopsis* sp. (Fig. 16A). para los iniciadores Neo_Tub2.B1F/Neo_Tub2_B1R, evidenció un pico de fusión de alrededor de 81.9 °C específico para *Neopestalotiopsis* sp. y 83 °C específico para *N. rosae* (Fig. 16B). Por lo que a través de los resultados HRM de cada conjunto de iniciadores utilizados por separado en esta prueba molecular se pudo diferenciar 159 aislamientos como *N. rosae*. y 1 aislamiento como *Neopestalotiopsis* sp.

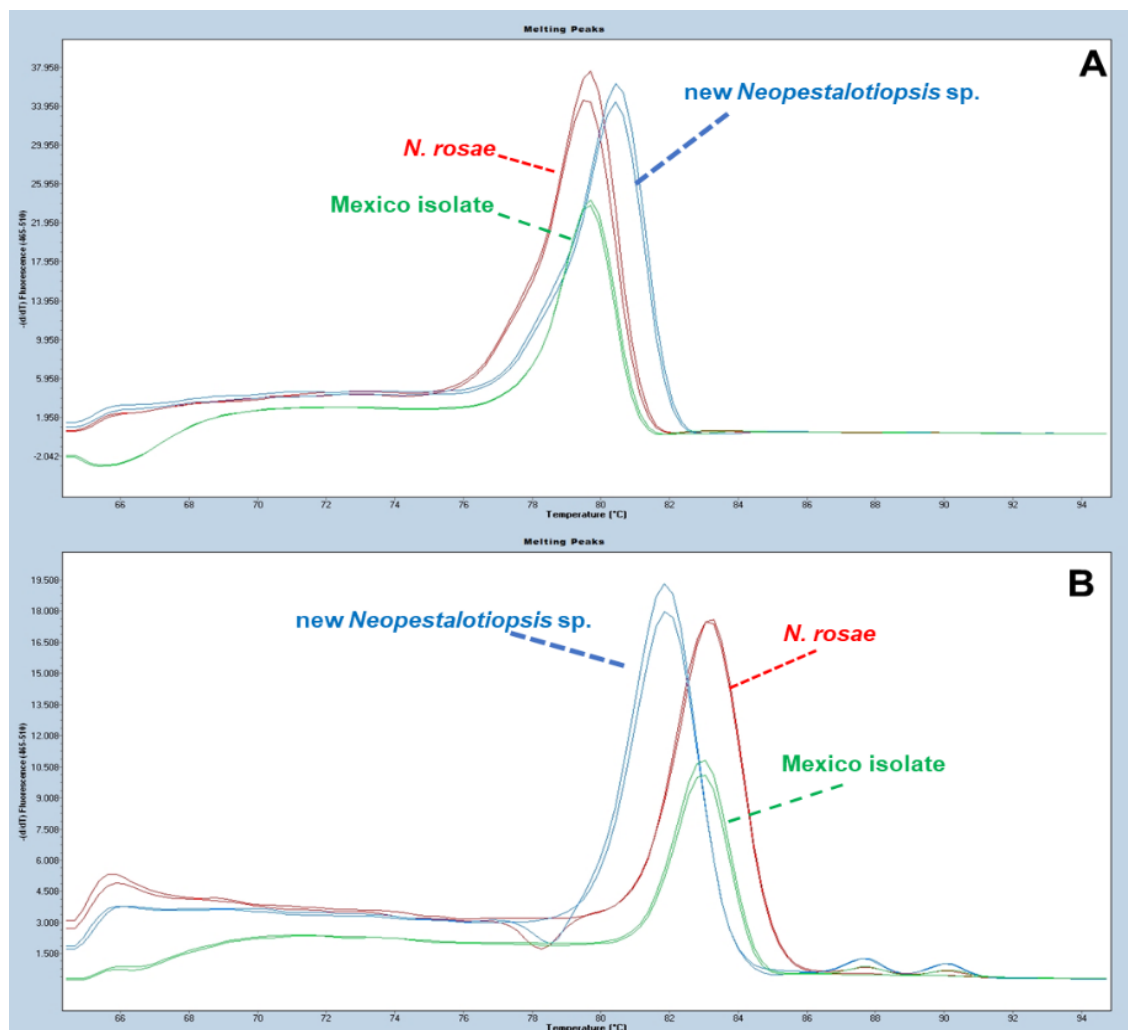


Figura 16. Curvas de fusión producidas mediante la prueba HRM. A) Neo_Tub2_A1F/Neo_Tub2_A1R; B) Neo_Tub2.B1F/Neo_Tub2_B1R.

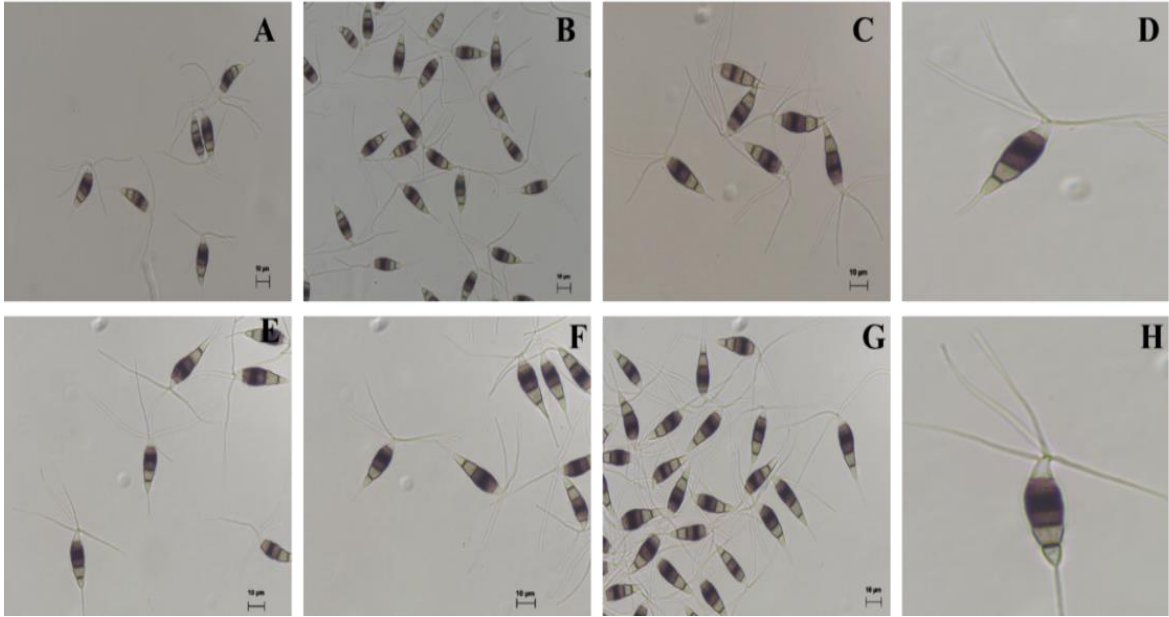


Figura 17. Conidios de *Neopestalotiopsis* spp. A-D) Conidios de *N. rosae*; E-H) *Neopestalotiopsis* sp.

2.4. DISCUSIÓN

En los últimos cinco años *Neopestalotiopsis* spp. ha ocasionados graves daños a nivel mundial en el cultivo de fresa en condiciones favorables para su desarrollo, provocando grandes pérdidas económica a los productores, ya que afecta prácticamente toda la planta, presentado pudrición de raíz, corona, manchas foliares, así como daños en fruto (Rebollar-Alviter et al. 2020; Sun et al. 2021; Baggio et al. 2021). En nuestra investigación se identificaron molecularmente un total de 160 aislamientos representativos de las zonas muestreadas y posteriormente un subconjunto de 29 aislamientos de los cuales se determinó la identificación morfológica, así como pruebas de patogenicidad. Lo que demuestra que la pudrición de raíz, corona y manchas foliares son ocasionadas por *N. rosae*, lo que concuerda con estudios reportados en Egipto (Essa et al. 2018), México (Rebollar-Alviter et al. 2020), Taiwán (Wu et al. 2020), China (Sun et al. 2021) y Estados Unidos (Baggio et al. 2021). Además de identificar 159 aislamientos como *N. rosae* mediante la técnica HRM se identificó un aislamiento como *Neopestalotiopsis* sp., demostrado mediante las curvas de fusión de esta técnica, por lo que, estos resultados concuerdan con el reporte de Rebello et al. (2022), (reporte en revisión), en el que informan a *N. rosae* y *Neopestalotiopsis* sp. sin embargo, estos autores mencionan que en Florida predomina en mayor medida *Neopestalotiopsis* sp. el que consignan como la principal especie que ocasionando daños severos en esa zona, por lo que, lo consideran como patógeno más agresivo que *N. rosae* caso contrario lo que sucede con este patógeno en Egipto, México, Taiwán y China ya que es la especie que está causando grandes pérdidas en más del 70 % de la producción. Si bien, no existe más información de esta técnica de identificación molecular aplicada a este patógeno contra este hospedante, sin embargo, en estudios realizado contra otros patógenos se tiene evidencia de la utilidad de la técnica, identificándose *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *P. andina* y *M. phaseolina* (Ratti et al. 2019; Wang et al. 2021). Así como, otros patógenos aislados como *Monilinia* spp. y *M. fructicola* (Papavasileiou et al. 2016) *V. inaequalis* (Chatzidimopoulos et al. 2019), *F. cerialis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*. (Schiwek et al. 2020). En cuanto a las características morfológicas de los 29 aislamientos fue

muy variable, presentando diferencias en el diámetro del crecimiento final, así como la coloración, la textura del micelio, la producción de acérvulos, la elevación del micelio, los márgenes, por lo que no son confiables como medio de identificación. Dichas variaciones fueron reportadas por Maharachchikumbura et al. (2014), mencionando que las condiciones ambientales juegan un papel importante para la variación de *Neopestalotiopsis* spp. En cuanto a la característica morfológica conidial, no se logró diferenciar entre *N. rosae* y *Neopestalotiopsis* sp. ya que los conidios son muy similares presentando las células medias versicolores. Solo se logró identificar que los aislamientos correspondían al género *Neopestalotiopsis* spp. ya que, de acuerdo con Liu et al. (2010), antes de la segregación de *Neopestalotiopsis* spp. reportaron que algunas características de los conidios de *Pestalotiopsis* spp. fueron estables como el color de las células versicolores y concoloras, así como el ancho y largo de los conidios. Este mismo autor menciona que la morfología conidial no es suficiente para la identificación de especies de estos géneros. Wang et al. (2019), en su reporte mencionan dicha estabilidad de los conidios. Sin embargo, Maharachchikumbura et al. (2014). menciona que, aunque presenten longitudes similares no se agrupan necesariamente a una especie en específico.

Los estudios de variabilidad patogénica indicaron que los 29 aislamientos mostraron diferentes grados de virulencia en este caso hubo una variabilidad en el Pi, siendo los aislamientos 13, 16, 14, 24 y 10 los que comenzaron a presentar síntomas de 12-24 HDI, sin embargo, el 55% de los aislamientos comenzó a presentar síntomas 24 HDI, y solo el 13% 72 HDI, dicha variación se atribuye a la virulencia que presenta cada aislamiento. Por lo que, se determinó que a pesar de pertenecer a *N. rosae*. hay un cierto grado de variabilidad patogénica entre aislamientos, lo que a su vez se refleja en los fenotipos de los aislamientos y en la virulencia (Sánchez et al. 2016), esto se ve reflejado también en el análisis por conglomerados ya que se determinaron seis agrupamientos. Nuestros resultados son similares a los reportados por Wang et al. (2019), en el que mencionan que especies similares de *Pestalotiopsis* presentaron una variación en su patogenicidad y virulencia en hojas de té. En nuestro estudio las pruebas de patogenicidad

realizadas con los 29 aislamientos se inocularon en hojas desprendidas de fresa de la variedad Fortuna. Aunado a esto se determinó la susceptibilidad de variedades, con el aislamiento (13) en la que Marisol fue la variedad menos susceptible con una severidad inferior al 10 %, contraria a la variedad Fortuna que presentó un 100 % de severidad, así como, un Pi de 12 h y una duración de 8 días en dañar por completo la Lf. Así mismo, Albion y Festival fueron de las variedades más susceptibles. En estas dos variedades se ha reportado a *N. rosae* causando daños severos directamente en campo en Egipto y México (Essa et al. 2018; Rebollar-Alviter et al. 2021). Por lo que, con nuestra investigación corroboramos la existencia de susceptibilidad a *N. rosae*. presentando en las variedades en estudio presentando un Pi corto a diferencia de las demás variedades que osciló entre 60 y 110 h DDI. También se han reportado susceptibles estas variedades a otras especies y géneros como *N. mesopotámica* (Hidrobo et al. 2021). *Neopestalotiopsis* sp. (Baggio et al. 2021), así como a *P. longisetula* y *Pestalotiopsis* sp. (Mouden et al. 2014; Ara et al. 2021). Maharachchikumbura et al. (2011), mencionan que en el caso de algunas especies de *Pestalotiopsis* spp. las hifas penetran en los espacios de las células de las hojas de algunas leguminosas cuando las hojas se encuentran en estado maduro por lo que, también depende del grosor de la cutícula y de la producción de fitotoxinas como pestalopironas, hidroxipestalopironas y pestalocidos, por lo que, su Pi depende de dicha maduración. Por su parte, Rodrigues et al. (2014), evaluaron el proceso de infección de *P. longisetula* reportando 48 HDI la germinación de los conidios y 96 HDI la penetración intracelular. Por lo que, en nuestra investigación, de acuerdo con la presencia de síntomas iniciales hubo variación en las variedades utilizadas evidenciando el daño a partir de las 12 HDI, por lo tanto, el proceso de germinación y penetración del aislamiento 13 fue diferente manifestando variación con el reporte anterior, realizado en hojas de fresa de la variedad Camarosa, las cuales no se desprendieron de las plantas. En el caso de nuestra investigación las variedades que se utilizaron presentaron diverso grosor de lámina foliar, para lo cual, la variedad fortuna evidenció menor grosor que el resto de las variedades, lo que se relaciona con una mayor susceptibilidad probablemente debido a lo mencionado

anteriormente. Resultados obtenidos por Wang et al. (2019) son similares a nuestros resultados en cuanto a la variabilidad patogénica, ya que mencionan que *N. ellipsospora* varió en su patogenicidad entre diferentes variedades de té. Por otro lado, variedades como Albión ha sido reportadas como susceptibles a *M. phaseolina*, sin embargo, Festival es menos susceptible comparada con Albión (Sánchez et al. 2016). Estos resultados demuestran la variabilidad patogénica que existe entre aislamientos de *N. rosae* por lo que, con los datos obtenidos en base a las variables evaluadas se puede tener presente el momento oportuno en el cual se puede implementar un programa de manejo para el control de este patógeno. Así como, alternativas de establecimiento de variedades menos susceptibles.

2.5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio se identificó mediante la técnica HRM a *N. rosae* y *Neopestalotiopsis* sp. y se demostró que todos los aislamientos evaluados fueron patogénicos, sin embargo, hubo variabilidad en cuanto al Periodo de incubación de manera general, agrupándose de acuerdo con similitudes, sin embargo, los aislamientos más agresivos no necesariamente provienen de un mismo órgano ni de una zona o región en particular, sino que fue muy variado. Los aislamientos más virulentos tienen una relación crecimiento del micelio y el periodo de incubación.

Asimismo, se evidenció una gran variabilidad morfológica aun perteneciendo a la misma especie, formando ocho grupos morfológicos. En cuanto a la morfología de los conidios se mantuvieron estables las medidas de largo y ancho del conidio, y el color versicolor de las células intermedias, por lo que, se identificó como *Neopestalotiopsis* spp. y se concluye que para la identificación de especies de este género no es suficiente la morfología.

En cuanto a la susceptibilidad de variedades hubo diferencias entre ellas, siendo la variedad Marisol la menos susceptible seguida por San Andrea, Rociera, Shyra, Sensation, Camino Real, Frontera, Festival, Albion, por lo que, Fortuna presentó 100% de severidad, menor periodo de incubación del patógeno y menor día en presentar la lámina foliar total dañada.

2.6. LITERATURA CITADA

- Ara, T., Monzur, S., Saand, M. A., Islam, R., Alam, S., and Hossain, M. 2017. The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. *Int. J. Biosci.* 11: 350-358.
- Ayoubi, N., and Soleimani, M. J. 2016. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis asiatica* causing leaf spot on sweet almond. *J. Plant Pathol.* 98: 321-325.
- Baggio, J. S., Cordova, L. G., and Peres, N. A. 2019. Sources of inoculum and survival of *Macrophomina phaseolina* in Florida strawberry fields. *Plant Dis.* 103: 2417-2424.
- Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., and Peres, N. A. 2021. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Dis.* 105: 305-315.
- Chamorro, M., Aguado, A., and De los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Dis.* 100: 1495.
- Chatzidimopoulos, M., Ganopoulos, I., Moraitou-Daponta, E., Lioliopoulou, F., Ntanti, O., Panagiotaki, P., and Vellios, E. K. 2019. High-resolution melting (HRM) analysis reveals genotypic differentiation of *Venturia inaequalis* populations in Greece. *Front. Ecol. Evol.* 7: 489.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., and Samson, R. A. 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands. Crous PW, Wingfield MJ. 1994. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon.* 51: 341-435.
- Essa, T. A., Kamel, S. M., Ismail, A., and El-Ganainy, S. 2018. Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. *Egypt. J. Phytopathol.* 46: 1-19.
- Fuentes-Aragón, D., Juárez-Vázquez, S. B., Vargas-Hernández, M., and Silva-Rojas, H. V. 2018. *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. "Hass". *Mycobiology* 46: 92-100.
- Gilardi, G., Bergeretti, F., Gullino, M. L., and Garibaldi, A. 2019. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry in Italy. *Plant Dis.* 103: 2959-2959.

- Hidrobo, J., Ramirez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Herrera, K., and Leon-Reyes, A. 2021. First report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on strawberry in Ecuador. *Plant Dis.* 106: 1066.
- Hyde, K. D., Tennakoon, D. S., Jeewon, R., Bhat, D. J., Maharachchikumbura, S. S., Rossi, W., ... and Doilom, M. 2019. Fungal diversity notes 1036–1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. *Fungal Divers.* 96: 1-242.
- Intriago-Reyna, H. O., Rivas-Figueroa, F. J., Rivera-Casignia, Á. M., and Álvarez-Romero, P. I. 2021. Outbreaks of crown rot in *Fragaria* × *ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador. *Emir J. Food Agric.* 33: 520-527.
- Jian, Y., Li, Y., Tang, G., Zheng, X., Khaskheli, M. I., and Gong, G. 2021. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of strawberry in Sichuan Province, China. *Plant Dis.* 105: 3025-3036.
- Koike, S. T., and Gordon, T. R. 2015. Management of Fusarium wilt of strawberry. *Crop Prot.* 73: 67-72.
- Lê, S., Josse, J. and Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software.* 25(1). pp. 1-18.
- Li, L., Yang, Q., and Li, H. 2021. Morphology, phylogeny, and pathogenicity of *Pestalotioid* species on *Camellia oleifera* in China. *J. Fungi* 7: 1080.
- Liu, A. R., Chen, S. C., Wu, S. Y., Xu, T., Guo, L. D., Jeewon, R., & Wei, J. G. (2010). Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57: 528-535.
- Machín, A., González, P., Vicente, E., Sánchez, M., Estelda, C., Ghelfi, J., and Silvera-Pérez, E. 2019. First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on strawberry in Uruguay. *Plant Dis.* 103: 2946-2946.
- Mahapatra, S., Banerjee, J., Kumar, K., Pramanik, S., Pramanik, K., Islam, S., and Das, S. 2018. Leaf spot and fruit rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Indo-Gangetic plains of India. *Ind. Phytopathol.* 71: 279-283.
- Maharachchikumbura, S. S., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., and Hyde, K. D. 2011. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Divers.* 50: 167-187.
- Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., and Crous, P. W. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Stud. Mycol.* 79: 121-186.
- Marin, M. V., Seijo, T., Oliveira, M. S., Zuchelli, E., Mertely, J., and Peres, N. A. 2018. First report of *Phytophthora nicotianae* causing crown rot of strawberry in the United States. *Plant Dis.* 102: 1463-1463.

- Mouden, N., Benkirane, R., Touhami, A. O., and Douira, A. 2014. Pathogenic capacity of *Pestalotia longisetula* Guba reported for the first time on strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) in Morocco. Int. J. Pure. App. Biosci. 2: 132-41.
- Nellist, C. F., Vickerstaff, R. J., Sobczyk, M. K., Marina-Montes, C., Wilson, F. M., Simpson, D. W., ... and Harrison, R. J. 2019. Quantitative trait loci controlling *Phytophthora cactorum* resistance in the cultivated octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Hortic. Res. 6: 1-14.
- Obregón, V. G., Meneguzzi, N. G., Ibañez, J. M., Lattar, T. E., and Kirschbaum, D. S. 2018. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. Plant Dis. 102: 1856-1856.
- Papavasileiou, A., Madesis, P. B., and Karaoglanidis, G. S. 2016. Identification and differentiation of *Monilinia* species causing brown rot of pome and stone fruit using high-resolution melting (HRM) analysis. Phytopathology 106: 1055-1064.
- Park, K., Han, I., Lee, S. M., Choi, S. L., Kim, M. C., and Lee, H. 2019. Crown and root rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. Korean. J. Mycol. 47: 427-435.
- Ratti, M. F., Farrer, R. A., Cano, L. M., Faedda, R., and Goss, E. M. 2019. Evaluation of high-resolution melting for rapid differentiation of *Phytophthora* hybrids and their parental species. Plant Dis. 103: 2295-2304.
- Rebello, C. S., Wang, N. Y., Marin, M. V., Baggio, J. S., and Peres, N. A. 2022. Detection and differentiation of *Neopestalotiopsis* spp. from strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) in florida using a high-resolution melting (HRM) analysis. Phyto. Front. (revision process).
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., and Parra-Robles, B. E. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. Plant Dis. 104: 2054-2059.
- Rodrigues, F. A., Silva, I. T., Antunes Cruz, M. F., and Carré-Missio, V. 2014. The infection process of *Pestalotiopsis Longisetula* leaf spot on strawberry leaves. J. Phytopathol. 162: 690-692.
- Salicini, I., Ibáñez, C., and Juste, J. (2011). Multilocus phylogeny and species delimitation within the natterer's bat species complex in the western palearctic. Mol. Phylogen. Evol. 61: 888-898.
- Sánchez, S., Henríquez, J. L., Urcola, L. A., Scott, A., and Gambardella, M. 2016. Susceptibility of strawberry cultivars to root and crown rot caused by *Macrophomina phaseolina*. J. Berry Res. 6: 345-354.

- Schiwek, S., Beule, L., Vinas, M., Pfordt, A., von Tiedemann, A., and Karlovsky, P. 2020. High-resolution melting (HRM) curve assay for the identification of eight *Fusarium* species causing ear rot in maize. *Pathogens* 9: 270.
- Shi, L. B., Li, Y., Fei, N. Y., Fu, J. F., and Yan, X. R. 2017. First report of *Neopestalotiopsis chrysea* causing twig dieback of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in China. *Plant Dis.* 101: 506-506.
- Sigillo, L., Ruocco, M., Gualtieri, L., Pane, C., and Zaccardelli, M. 2020. First report of *Neopestalotiopsis clavisporea* causing crown rot in strawberry in Italy. *J. Plant Pathol.* 102: 281-281.
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., Yan, J., Zhang, W., and Li, X. 2021. Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Prot.* 147: 105710.
- Tennakoon, D. S., Kuo, C. H., Maharachchikumbura, S. S., Thambugala, K. M., Gentekaki, E., Phillips, A. J., Bhat, D. J., Wanasinghe, D. N., Silva, N. I. D., Promputtha, I., and Hyde, K. D. 2021. Taxonomic and phylogenetic contributions to *Celtis formosana*, *Ficus ampelas*, *F. septica*, *Macaranga tanarius* and *Morus australis* leaf litter inhabiting microfungi. *Fungal Divers.* 108: 1-215.
- Wang, N. Y., Gama, A. B., Marin, M. V., and Peres, N. A. 2021. Development of a multiplex high-throughput diagnostic assay for the detection of strawberry crown rot diseases using high-resolution melting analysis. *Phytopathology* 111: 1470-1483.
- Wang, S., Mi, X., Wu, Z., Zhang, L., and Wei, C. 2019. Characterization and pathogenicity of *Pestalotiopsis*-like species associated with gray blight disease on *Camellia sinensis* in Anhui province, China. *Plant Dis.* 103: 2786-2797.
- Wu, H. Y., Tsai, C. Y., Wu, Y. M., Ariyawansa, H. A., Chung, C. L., and Chung, P. C. 2020. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. *Plant Dis.* 105: 487-487.

CAPÍTULO III

EFFECTO DIFERENCIAL DE TRATAMIENTOS PRE- Y POST-TRANSPLANTE PARA EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ Y CORONA DE LA FRESA CAUSADA POR *Neopestalotiopsis rosae*

RESUMEN

Neopestalotiopsis rosae es la principal especie causante de la pudrición de raíz, corona y tizones foliares de la fresa, la cual se ha convertido en limitante para la producción en las zonas productoras a nivel mundial. En México, las pérdidas de planta han superado el 80% en niveles altos de severidad de la enfermedad. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de fungicidas biológicos y químicos en pre y post-infección para el control de la pudrición de corona causada por *N. rosae* en plantas de fresa. El estudio se realizó en la variedad Camino Real en invernadero, bajo un diseño de bloques completos al azar. Los productos utilizados fueron; procloraz, procloraz + thiram, cyprodinil + fludioxonil, difenoconazol + azoxystrobin, iprodiona, captan, thiram, pydiflumetofeno + fludioxonil, fluxapyroxad + pyraclostrobin, *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma asperellum*, *Streptomyces* spp. *Bacillus amyloliquefaciens* e hymexazol, aplicados a las dosis comerciales en pre- y post-infección. Se evaluó la incidencia, severidad, ABCPE, peso fresco, peso seco y longitud de raíz. Los resultados pre-infección indicaron que los fungicidas pydiflumetofeno + fludioxonil, cyprodinil + fludioxonil y procloraz, presentaron una eficacia en la incidencia y severidad de 67.20-86.93, 50.71-78.01 y 46.21-77.69% respectivamente, además presentaron menor ABCPE. El pydiflumetofeno + fludioxonil, favoreció el mayor crecimiento radical de la planta, con un mayor peso seco y peso fresco. En contraste, los resultados en post-infección variaron indicando que los fungicidas procloraz + thiram e hymexazol presentando una eficacia en la incidencia y severidad de la enfermedad significativamente en un 20.06-26.68 y 18.44-26.00 % respectivamente, sin embargo, el que presentó menor severidad fue thiram con un 30.63 %, pero fueron significativamente menos efectivos cuando se aplicaron en pre-infección. Los tratamientos con hymexazol, *T. asperellum* y *T. koningiopsis* presentaron mayor longitud radical en comparación con el resto de los tratamientos. El procloraz e hymexazol resultaron en mayor peso fresco y peso seco para el experimento post-infección. El difenoconazol + azoxystrobin en general resultó con un efecto intermedio en todas las variables para ambos experimentos. Los tratamientos menos efectivos en ambos experimentos fueron el fluxapyroxad + pyraclostrobin y *B. amyloliquefaciens*. Los resultados de este estudio pueden usarse como un enfoque de manejo integral en aplicaciones preventivas principalmente brindando protección a las plantas.

Palabras clave: fresa, pudrición de corona, control biológico.

3.1. INTRODUCCIÓN

En México, la fresa se cultiva en 12,974.84 ha distribuidas en 14 estados, siendo Puebla, Aguascalientes, Baja California, Jalisco, Estado de México, Guanajuato y Michoacán los estados que cuentan con la mayor superficie sembrada alcanzando un total de 12, 938.59 ha. Entre estos, Michoacán sobresale como el principal productor de fresa en México, en las regiones del valle de Zamora-Jacona, Panindicuario, Tangancícuaro y Maravatío con una superficie de 5,011.37 ha en producción (SIAP, 2022).

El cultivo presenta varias limitantes entre las que destacan los problemas fitopatológicos. Recientemente, las especies de *Neopestalotiopsis* han llamado la atención en el mundo como un patógeno causante de pudriciones de raíz y corona, mancha foliar, pudrición de fruto, tizón de hoja, tizón de cáliz y receptáculo (Chamorro et al. 2016; Rebollar-Alviter et al. 2020; Shi et al. 2021; Baggio et al. 2021). Estos síntomas se han asociado a la presencia de *N. rosae* (Rebollar-Alviter et al. 2020; Sun et al. 2021)), aunque especies como *N. clavispora* (Sigillo et al. 2020; Shi et al. 2021), *N. mesopotamica* y *N. iranensis* (Ayoubi y Soleimani, 2016; Hidrobo et al. 2021; Intriago-reyna et al. 2021), han sido reportadas causando pérdidas que superan el 80% en campo, en especial, cuando las plantas que se establecen vienen infectadas desde el vivero.

Dada la condición de emergente, la información sobre la epidemiología y manejo de la enfermedad es aún escasa. Los estudios realizados por Rebollar-Alviter et al. (2020) y Baggio et al. (2021) sugieren que el hongo se dispersa a largas distancias mediante plantas infectadas en los viveros y al interior de la parcela mediante el salpique por lluvia asociada a manchas foliares o raíces infectadas que resulta en la pudrición de raíz y corona (Rebollar-Alviter, no publicado). Hasta ahora, los estudios para el manejo de la enfermedad recomiendan el uso de fungicidas con diferentes modos de acción. Entre estos, se encuentra los estudios realizados por Obregón et al. (2018) en Argentina contra *N. clavispora* indicando que el cyprodinil + fludioxonil, boscalid + pyraclostrobin y difenoconazol + azoxystrobin inhibieron el crecimiento

micelial *in vitro* en un 80.1, 77.69 y 75.67 % respectivamente. En Egipto, Essa et al. (2018) indicaron que el thiram e hymexazol inhibieron el crecimiento micelial de *N. rosae* a 1000 y 1250 ppm respectivamente; además, reportaron que thiram redujo la incidencia de la enfermedad con una eficacia del 80 % seguido de hymexazol con 79.07 %. Por su parte Amrutha y Vijayaraghavan (2018), informaron que el carbendazim + mancozeb, cimoxanil + mancozeb, hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre y propineb inhibieron en un 100% el crecimiento de *N. clavispora* bajo condiciones *in vitro*. Estos mismos autores, indicaron que en planta el propineb y carbendazim + mancozeb redujeron la enfermedad en un 74 %. En Estados Unidos, Baggio et al. (2019), reportaron que *Neopestalotiopsis* sp. fue sensible a captan y fludioxonil *in vitro*. Además, reportaron por primera vez la ocurrencia de la mutación G143A en el gen *cytb* que confiere resistencia a fungicidas Qol. Posteriormente, Baggio y Peres, (2020), reportaron que cyprodinil + fludioxonil y thiram presentaron eficacia en el control de *Neopestalotiopsis* sp., en campo contra la pudrición de fruto presentando solo 9.0 y 13.0 % de incidencia de la enfermedad tratados con los fungicidas mencionados. Además, el clorotalonil, mancozeb, fluazinam y fludioxonil + pydiflumetofeno presentaron cierto grado de control en un 13.8, 17.3, 14.7 y 14.7 % de incidencia respectivamente. En México, *N. rosae* fue sensible *in vitro* a cyprodinil + fludioxonil, captan, iprodiona, difenoconazole y procloraz en un 100% a la dosis intermedia comercial (Rebollar-Alviter et al. 2020). En general, muy pocos estudios en campo e invernadero han reportado evidencias de la eficacia de fungicidas que puedan ser usados en el manejo de la enfermedad, tanto en síntomas foliares como en raíz y corona.

De manera similar, pocos estudios han demostrado la eficacia del control biológico en el manejo de la enfermedad, en especial ejerciendo mecanismos de acción tales como competencia, antibiosis, micoparasitismo e inducción de resistencia (Singh et al. 2018). Amrutha y Vijayaraghavan (2018), reportaron una eficacia cerca del 70% de *Trichoderma asperellum* contra *N. clavispora* agente causal del tizón de la hoja en fresa bajo condiciones *in vitro*. Además de actuar mediante mecanismos de bioprotección, se ha reportado diferentes especies de *Trichoderma* como solubilizadores de nutrientes (Bononi et al. 2020; Tandon et al. 2020),

bioestimulación (Fiorentino et al. 2018) y biorremediación (Tripathi et al. 2013; Alothman et al. 2020; Daccò et al. 2020).

En el mismo sentido, el uso de bacterias antagónicas tiene potencial para incorporarlas en un plan de manejo integrado de la enfermedad. El género *Bacillus* posee características importantes como la formación de endosporas resistentes a agentes perjudiciales como la desecación, los ácidos grasos y desinfectantes químicos; por lo que, su uso representa una alternativa como agente de control biológico. Además, se ha documentado diferentes mecanismos de acción como la producción de lipopéptidos, que originan la formación de poros y un desbalance osmótico, producción de sideróforos, enzimas líticas, endotoxinas e inductores de la resistencia sistémica de la planta (ISR) (Hashem et al. 2019). Otro agente de control biológico es *Streptomyces* spp. ya que produce compuestos bioactivos antimicrobianos, los cuales en su mayor parte actúan mediante mecanismos de antibiosis e inducción de resistencia (Suárez-Moreno et al. 2019; Chaiarn et al. 2020).

Dada la condición de emergente, poco se conoce sobre las alternativas para el manejo de la pudrición de corona y raíz de la fresa, por lo que es necesario determinar el efecto separado de fungicidas químicos y biológicos aplicados antes y después de la infección en planta, considerando no solo los resultados reportados *in vitro*, sino también el momento de aplicación con relación a la infección, previo al trasplante. En este periodo crítico, es necesario conocer la eficacia del producto químico o biológico, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de fungicidas biológicos y químicos en pre y post-infección para el control de la pudrición de corona causada por *N. rosae* en plantas de fresa. Estos estudios contribuirán al diseño de estrategias de manejo integrado para reducir las pérdidas de planta y de producción de fresa por pudrición de corona, partiendo desde el trasplante.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Incremento de inóculo

Para este estudio, se utilizó el aislamiento CRM-FRC, previamente identificado como *N. rosae* (Rebollar-Alviter et al. 2020) y almacenado en glicerol a -20 °C. El hongo se reactivó en medio papa dextrosa agar (PDA, BIOXON), y se mantuvo a una temperatura de 25 °C durante 10 días. Para su incremento y posterior uso en las inoculaciones, se usaron matraces de 250 ml, los cuales contenían 25 g de semillas de trigo y 20 ml de agua destilada, posteriormente se esterilizaron en autoclave a 120 °C y 15 lb de presión durante 30 min. Después de enfriarse, los matraces con el grano de trigo se inocularon con 10 discos de micelio tomado del margen de la colonia de *N. rosae*, los cuales se incubaron a 25 °C por 15 días en oscuridad, agitándose diariamente de forma manual para evitar que se compactara el grano de trigo y de esta forma obtener una producción de acérvulos homogénea (Sun et al., 2021).

A los 15 días de incubación, a cada matraz se le agregó 150 ml de agua para preparar una suspensión conidial. Esta suspensión se filtró en gasas estériles, para eliminar segmentos de micelio. La concentración de la suspensión de conidios se determinó con un hematocitómetro (Marienfeld) y se ajustó a 1×10^6 conidios ml⁻¹ con agua destilada estéril; el conteo se realizó en un microscopio Carl Zeiss (Modelo Primo Star, Alemania).

Para el incremento de inóculo de las cepas utilizadas de *T. asperellum* y *T. koningiopsis* se siguió el mismo procedimiento solo se cambió el sustrato por arroz quebrado y se ajustó la concentración 2×10^6 conidios ml⁻¹. Los matraces con arroz inoculado se incubaron a 25 °C por 7 días, agitándose diariamente para evitar la compactación del arroz. Las cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas fueron colectadas y aisladas en investigaciones anteriores en el Centro Regional Universitario Centro Occidente Morelia (CRUCO).

3.2.2. Material vegetal y establecimiento del experimento

Se usaron plantas de fresa de la variedad Camino Real sin hojas, las cuales se habían mantenido en frío a 4 °C por aproximadamente 3 meses. Dichas plantas, fueron producidas en un vivero en suelo en Cd. Guzmán, Jalisco y donadas por el vivero Lasen Canyon®. Dado que, en estudios previos, se identificó que *N. rosae* puede dispersarse a largas distancias por medio de plantas de vivero (Rebollar-Alviter et al. 2020), antes de establecer el experimento, las plantas que mostraron algún síntoma en las raíces fueron eliminadas. Posteriormente, se seleccionaron 10 plantas sintomáticas y 10 asintomáticos, las cuales se lavaron con agua de la llave para remover el suelo. El aislamiento de los hongos se realizó en medio PDA, siguiendo los protocolos establecidos (Rebollar-Alviter et al., 2020). En los dos experimentos realizados que se describen a continuación, se usó como sustrato Peat Moss (Sunshine®), en bolsas negras de 15 × 25 cm, se regaron cada tercer día con agua para mantener las plantas a capacidad de campo, con 60 ml de agua por planta y una conductividad eléctrica de 0.1 mS.

3.2.3. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron 16 tratamientos que consistieron en 10 fungicidas químicos y 4 biológicos (Cuadro 1) incluyendo dos controles (inoculado y no inoculado). Dichos tratamientos se evaluaron en dos experimentos separados; en el primero, los tratamientos se aplicaron en pre-transplante, antes de la inoculación (pre-infección) con *N. rosae* y en el segundo, los tratamientos se aplicaron después del transplante y 12 h después de la inoculación (post-infección). Ambos experimentos se establecieron en un invernadero (25 °C) bajo un diseño en bloques completos al azar con cuatro replicaciones. La unidad experimental la constituyó un grupo de 10 plantas y cada experimento se realizó dos veces.

Cuadro 1. Productos empleados en los experimentos pre y post-infección en el manejo de la pudrición de corona causada por *Neopestalotiopsis rosae* en plantas de fresa en época de transplante.

T.	Ingrediente activo	Nombre comercial	Grupo químico	Compañía	Formulación	Dosis kg o L ha ^{-1(a)}
1	Procloraz	Sportak® CE	Imidazol	FMC	CE ^Z	1.2
2	Procloraz + Thiram	Sportak® CE + Thiram® 80GD	Imidazol+ditiocarbamato	FMC, Adama	CE + GD ^Y	1.0 + 2.0
3	Cyprodinil + Fludioxonil	Switch® 62.5WG	Pirimidina+fenilpirrol	Syngenta	WG ^X	1.0
4	Difenoconazol + Azoxystrobin	Amistar Gold® SC	Estrobilurina+triazol	Syngenta	SC ^W	0.5
5	Iprodiona	Rovral® 50PH	Dicarboxamida	FMC	PH ^V	1.5
6	Captan	Captan® ultra 50WP	Ftalimida	Arysta	WP ^U	1.2
7	Thiram	Thiram® 80 GD	Ditiocarbamato	Adama	GD	2.4
8	Pydiflumetofeno + Fludioxonil	Miravis® Prime SC	Pirazolcarboxamida+fenilpirrol	Syngenta	SC	0.9
9	Fluxapiroxad + Pyraclostrobin	Merivon® SC	Pirazolcarboxamida+estrobilurina	BASF	SC	0.35
10	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	RCH-169	Microbiales	UACH	CL ^T	2x10 ⁶
11	<i>Trichoderma asperellum</i>	RG-160	Microbiales	UACH	CL	2x10 ⁶
12	<i>Streptomyces</i> spp.	Blite free® CL	Microbiales	Altus	CL	5.4
13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	DoubleNickel® LC	Microbiales	SummitAgro	CL	1.2
14	Testigo sin inocular	-	-	-	-	1x10 ⁶
15	Testigo inoculado	-	-	-	-	-
16	Hymexazole	Tachigaren® 30SL	Isoxazol	SummitAgro	LS	0.6

T = Tratamientos

^a La dosis utilizada se determinó con base en la dosis intermedia recomendada en el cultivo de fresa o afín a frutillas, considerando un volumen de 600 L ha⁻¹.

^Z CE = concentrado emulsionable.

^Y GD = gránulos dispersables.

^X WG = gránulos dispersables

^W SC = suspensión concentrada.

^V PH = polvo humectable.

^U WP = polvo humectable

^T CL= concentrado líquido

La aplicación de los tratamientos químicos en ambos experimentos se realizó dos veces, aplicando un volumen de 60 ml de los fungicidas por planta con una probeta. Este volumen de agua se determinó mediante pruebas preliminares de mojado del sustrato hasta alcanzar la capacidad de campo. La primera aplicación en pre-infección se realizó 12 horas antes de la inoculación, por inmersión de raíz y corona de las plantas por 2 segundos en cada tratamiento. La segunda aplicación de este experimento se realizó 8 días después de la primera. Para el segundo experimento (aplicación post-infección-post-transplante), las plantas primeramente se transplantaron, se inocularon con *N. rosae* y 12 horas después se realizó la aplicación de los tratamientos; la segunda aplicación de este experimento también se realizó 8 días después de la primera. Los tratamientos biológicos se aplicaron de la misma manera, excepto que, en este caso, se realizaron 4 aplicaciones a intervalos de 8 días entre aplicación. Antes de inocular y de aplicar los tratamientos para los experimentos pre y post-infección se realizaron pequeños cortes transversales en las puntas de las raíces con tijeras esterilizadas y cuatro incisiones en la corona con una aguja estéril (Rebollar-Alviter et al. 2020). En todos los casos la suspensión para la inoculación de *N. rosae*, fue de 1×10^6 conidios ml^{-1} en un volumen de 60 ml por planta.

3.2.4. Variables evaluadas

En los dos experimentos, se evaluó la incidencia (proporción de plantas sintomáticas en relación con el total), la mortalidad (proporción de plantas muertas en relación con el total) y la severidad en tiempos irregulares. Para el experimento pre-infección se comenzó a evaluar 12 días después de la inoculación (DDI) posteriormente a los 19, 28, 32, 36 y 42 DDI, por lo tanto, el experimento tuvo una duración de 42 días. Para el experimento post-inoculación las evaluaciones comenzaron 20 DDI las que continuaron a los 24, 27, 30, 33, 39 y 43 DDI finalizando el experimento en esta última evaluación.

La severidad de la enfermedad se evaluó en las 10 plantas de cada unidad experimental con base en una escala ordinal de 5 categorías, elaborada *exprofeso* para esta enfermedad 0 = Planta sana, 1 = color púrpura que inicia en el margen de

un foliolo; 2 = coloración rojiza cubriendo un tercio del foliolo y nervaduras verde pálido, 3 = coloración rojiza en más del 50 % de la lámina foliar y nervaduras verde-amarillo, 4 = coloración rojiza en el 100 % de la lámina foliar en todos los folíolos e inicio de marchitez, 5 = Planta marchita (Fig. 1). Los valores obtenidos de la severidad de la enfermedad se transformaron a porcentaje (Yang et al. 2011).

$$S (\%) = \frac{\sum nv}{NV} \times 100$$

Donde:

S(%) = Severidad (%)

n = Número de plantas por categoría.

v = Grado de infección de acuerdo con la escala

N = Total de plantas evaluadas.

V = Grado más alto de infección.



Figura 1. Escala ordinal de severidad con categorías definidas de acuerdo con el desarrollo de los síntomas en plantas de fresa de la variedad Camino Real inoculadas con *Neopestalotiopsis rosae*.

Además, al final del experimento, se evaluó la biomasa foliar fresca y seca (g), biomasa radical fresca y seca (g), biomasa total fresca y seca (g) y longitud de raíz de la planta. Estas variables se midieron en una muestra de 5 plantas de cada unidad experimental, seleccionadas con diferentes niveles de severidad para obtener un valor promedio. Para ello se retiró el exceso de sustrato adherido a la raíz y se procedió a realizar el peso fresco de cada parte de la planta, las cuales fueron previamente etiquetadas. Para determinar el peso seco, cada una de las partes de la planta, se colocaron en bolsas de papel Kraft de 36.5 × 14 cm por cada tratamiento y repetición las que se colocaron en un horno de secado (Thermo scientific heratherm OGS180, Alemania) a 70 °C por 72 horas, enseguida se pesaron en una balanza electrónica (Denver instrument, TP-6101).

La longitud de raíz se determinó midiendo a partir de la base de la corona hacia la parte más distal de la raíz.

3.2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las diferentes variables se sometieron a un análisis de varianza ($\alpha = 0.05$), usando para ello el Proc Glimmix (Generalized Linear Mixed Models) de SAS (Statistical Analysis System ver. 9.4) considerando como efectos fijos a los tratamientos aplicados (productos químicos y productos biológicos) y como efectos aleatorios a las repeticiones (Bloques). Para el caso de la incidencia y la mortalidad se asumió una distribución binomial y para las variables continuas (Biomasa y longitud radical) una distribución Gaussiana. Debido a que las mediciones de intensidad de la enfermedad se realizaron en el tiempo (Tratamientos × tiempos de evaluación) sobre el mismo sujeto, las observaciones de un tiempo a otro estuvieron correlacionadas, por lo que, para determinar el efecto de los tratamientos, primeramente, se seleccionó el mejor modelo de covarianza con base en el valor más bajo del criterio de información de Akaike (AIC). Posteriormente se realizó una prueba de comparación de medias en la escala de logit (incidencia y mortalidad; LSD = 0.05) y los valores se transformaron a la escala de proporción mediante el inverso de la función vínculo (*ilink*) (Schabenberguer y Pierce, 2001). Adicionalmente, los tratamientos se compararon mediante el Área Bajo la Curva del

Progreso de la Enfermedad (ABCPE), la cual se calculó con base en Madden et al. (2007). Asimismo, los tratamientos se compararon considerando la intensidad final (incidencia, severidad y mortalidad). Para las variables continuas en las que se asumió una distribución normal, primeramente, se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas de Levene previo a realizar el ANOVA y comparación de medias. Debido a que cada experimento se realizó dos veces, la replicación del experimento anidado dentro de la repetición del experimento se consideró como factor aleatorio.

3.3. RESULTADOS

El análisis de las plantas utilizadas indicó que, de las plantas con síntomas de necrosis, se aisló *Fusarium* sp. en su mayoría y *Neopestalotiopsis* sp. solo en una planta en el interior de la corona, no así de las plantas que no mostraron síntomas de necrosis. Se seleccionaron aquellas plantas con el menor daño posible, aparentemente sanas. Estas plantas, provinieron de lotes que usaron los productores para establecer sus parcelas por lo que consideramos que los resultados obtenidos serían de aplicación y más alineados a la realidad.

Progreso de la enfermedad. Los primeros síntomas de coloración púrpura sobre las hojas en el control aparecieron 7 a 10 DDI (pre-transplante-pre-infección), las primeras plantas murieron a partir de los 30 días, alcanzando una mortalidad final cercana al 60% a las condiciones del invernadero (24-29 °C). El control no inoculado mostró síntomas de la enfermedad, producto de infecciones que ya venían en la planta desde vivero), la selección manual de plantas ayudó a reducir significativamente la intensidad de la enfermedad, sin embargo, aun con esta práctica, la mortalidad final en el control no inoculado alcanzó el 10%. La ocurrencia de infecciones de *Neopestalotiopsis* sp. en vivero, impuso un factor adicional en este experimento, el cual representa la realidad que están enfrentando los productores de fresa en la actualidad.

3.3.1. Efecto de tratamientos al transplante en pre-infección

Incidencia de la enfermedad. Los datos del experimento mostraron que la interacción entre el tiempo y los tratamientos no fue significativa ($P = 1.00$; $F = 0.41$), es decir el efecto de los tratamientos no cambió a lo largo de tiempo, sin embargo, si hubo diferencias significativas ($P < 0.0001$; $F = 61.58$) entre los factores principales (tiempo y tratamientos). Es decir, bajo un enfoque de medidas repetidas, en general el análisis evidenció tres grupos de tratamientos (Fig. 2A); un primer grupo que incluyó el pydiflumetofeno + fludioxonil, el cual se mantuvo con la menor incidencia durante 42 DDI, mostrando diferencias con el resto de los tratamientos y con el testigo inoculado y sin inocular, así mismo, presentó menor ABCPE (Fig. 2B)

y menor incidencia final (Cuadro 2). En el segundo grupo, el hymexazol presentó ligeramente menor valor de incidencia que procloraz de los 12 a los 39 DDI, sin embargo, a los 42 DDI la incidencia de plantas enfermas con el tratamiento de hymexazol fue mayor que la de procloraz, por lo tanto, de manera general el hymexazol no mostró diferencias significativas con el procloraz, además presentó efectos muy similares a los obtenidos con el cyprodinil + fludioxonil y procloraz + thiram al final del experimento, pero si evidenció diferencias con el testigo inoculado y sin inocular, el cual a su vez mostró ligeros síntomas de la enfermedad (Cuadro 2). El cyprodinil + fludioxonil y procloraz + thiram iniciaron con mayor incidencia que los tratamientos a base de procloraz solo y pydiflumetofeno + fludioxonil; sin embargo, 32 DDI, cyprodinil + fludioxonil presentó valores similares a procloraz y 39 DDI valores similares a hymexazol. Por lo que, el comportamiento de la incidencia de cyprodinil + fludioxonil fue a la baja reflejándose 42 DDI, ya que los valores fueron menores que los presentados por procloraz e hymexazol. Respecto a procloraz + thiram siempre mantuvo valores más altos en este grupo durante los 42 días de duración del experimento. De igual manera dichos tratamientos se reflejaron en el ABCPE en el mismo orden mostrando diferencias significativas con ambos controles y con los demás tratamientos (Fig. 2B). El tercer grupo de tratamientos lo constituyó *B. amyloliquefaciens* que presentó una incidencia inicial con valores bajos; sin embargo, fue uno de los tratamientos en el que se incrementó rápidamente la intensidad de la enfermedad, siendo uno de los que presentaron valores más altos a los 42 DDI, sin diferencias significativas con el testigo inoculado. En este grupo se incluye *T. koningiopsis*, *T. asperellum* y *Streptomyces* spp. el comportamiento de la incidencia a los 12 DDI fue similar, no obstante 32 DDI presentaron un comportamiento ligeramente diferente, siendo *T. koningiopsis* el que presentó menor valor de incidencia a través del tiempo a partir de los 32 DDI, sin diferencias significativas con el testigo sin inocular. Los tratamientos con mayor incidencia dentro de este grupo y en general comparados con los demás grupos fueron thiram, difenoconazol + azoxystrobin, captan, *B. amyloliquefaciens* y fluxapyroxad + pyraclostrobin, siendo este último el que presentó los valores más altos de incidencia a través del tiempo y presentó mayor ABCPE incluso con valores

superiores al testigo inoculado, pero sin diferencias significativas. Los demás tratamientos de este grupo evidenciaron mayor ABCPE de incidencia; sin embargo, no hubo diferencias significativas estadísticamente entre ellos, presentando diferencias significativas solo con el testigo sin inocular (Fig. 2B). De igual manera fueron los tratamientos que mostraron mayor incidencia final (Cuadro 2).

Severidad de la enfermedad. Los datos del experimento mostraron que la interacción entre el tiempo y los tratamientos fue significativa ($P < 0.0001$; $F = 9.68$), indicando que el efecto de los tratamientos cambió en función del tiempo (Fig. 2C). El control inoculado, mantuvo una tendencia creciente a lo largo del tiempo, en comparación con el testigo no inoculado, dicho testigo se mantuvo con mayor nivel de severidad, aunque no alcanzó el 100 % de esta. Aunque hubo diferencias significativas entre los tratamientos en cada tiempo de evaluación, el tratamiento a base de pydiflumetofeno + fludioxonil presentó la menor severidad durante el tiempo de evaluación, alrededor del 10 % presentando diferencias significativas con el resto de los tratamientos a partir de los 28 DDI, es decir, este tratamiento, mantuvo la enfermedad en un nivel bajo de severidad en comparación con el testigo inoculado y el resto de los tratamientos. Así mismo, el análisis de varianza del ABCPE ($P < 0.0001$; $F = 45.66$; Fig. 7D) y la severidad final ($P < 0.0001$; $F = 74.83$; Cuadro 2), confirmaron que dicho tratamiento mantuvo las plantas con un nivel bajo de la enfermedad presentando diferencias significativas con los controles (testigos). Un grupo de tratamientos en el que se incluyó a procloraz, cyprodinil + fludioxonil, hymexazol y procloraz + thiram el comportamiento inicial de la severidad fue similar sin diferencias significativas, durante 19 DDI, pero si presentaron diferencias con el resto de los tratamientos y el testigo inoculado. Sin embargo, 36 DDI las diferencias entre estos tratamientos fueron más evidentes por lo que, cyprodinil + fludioxonil y procloraz presentaron valores más bajos. Al final, el hymexazol y procloraz + thiram mostraron una tendencia más alta de severidad a los 42 DDI (Cuadro 2). Por lo tanto, dichos tratamientos del análisis de mediciones repetidas coinciden reflejándose en una menor ABCPE (Fig. 2D) y en la severidad final (Cuadro 2). Los tratamientos que incrementaron su severidad a partir de los 19 DDI fueron *T. asperellum* presentando un comportamiento similar con *T. koningiopsis*,

Streptomyces y difenoconazol + azoxystrobin, aunque si mostraron diferencias con el control inoculado, a partir de los 36 DDI. En este grupo también se encuentra el fungicida iprodiona, el cual se mantuvo con una severidad alta a los 32 DDI a partir de ese día siguió incrementándose, pero no con la misma tendencia, comparado con thiram, captan, *B. amyloliquifaciens* y fluxapyroxad + pyraclostrobin, tratamientos que desde el día 19 mostraron un incremento sostenido de la severidad a lo largo del tiempo, similar al control inoculado. Así mismo, fueron los tratamientos con mayor ABCPE (Fig. 2D) y severidad final reflejada (Cuadro 2) sin diferencias significativas con el testigo inoculado.

Mortalidad de la enfermedad. La interacción entre los factores tiempo y mortalidad fue significativa ($P < 0.0004$; $F = 1.65$) indicando que el efecto de los tratamientos varió dependiendo del tiempo de evaluación. Fue evidente que la mortalidad en el testigo inoculado y en el tratamiento a base de *B. amyloliquifaciens* inició a partir del día 12 DDI, en general, en los tratamientos con menor eficacia y los controles, la mortalidad de plantas inició a partir de los 32 DDI, mientras que, en los tratamientos con mayor eficacia, la mortalidad se incrementó a partir del día 36 DDI. Estos tratamientos correspondieron, a aquellos que tuvieron la menor incidencia y severidad. Debido a que la incidencia y severidad, no necesariamente culmina en plantas muertas, esta variable refleja la eficacia de los tratamientos en términos de supervivencia por cada tratamiento reforzando los resultados respecto a que el procloraz, procloraz + thiram, cyprodinil + fludioxonil y pydiflumetofeno + fludioxonil, resultaron con la más baja mortalidad en el tiempo (Fig. 2E), así como menor ABCPE (Fig. 2F) y menor mortalidad final (Cuadro 2). Similarmente, en los tratamientos a base de difenoconazol + azoxystrobin, *Streptomyces* spp., hymexazol, *T. koningiopsis*, *T. asperellum* e iprodiona la mortalidad se incrementó a partir de los 39 DDI mostrando diferencias significativas con los testigos. Los tratamientos a base de fluxapyroxad + pyraclostrobin, captan, *B. amyloliquifaciens* y thiram, no mostraron diferencias significativas con el control inoculado. Evidenciando mayor mortalidad final (Cuadro 2) y mayor ABCPE, cabe resaltar que *B. amyloliquifaciens* presentó valores superiores con respecto al control inoculado (Fig. 2F).

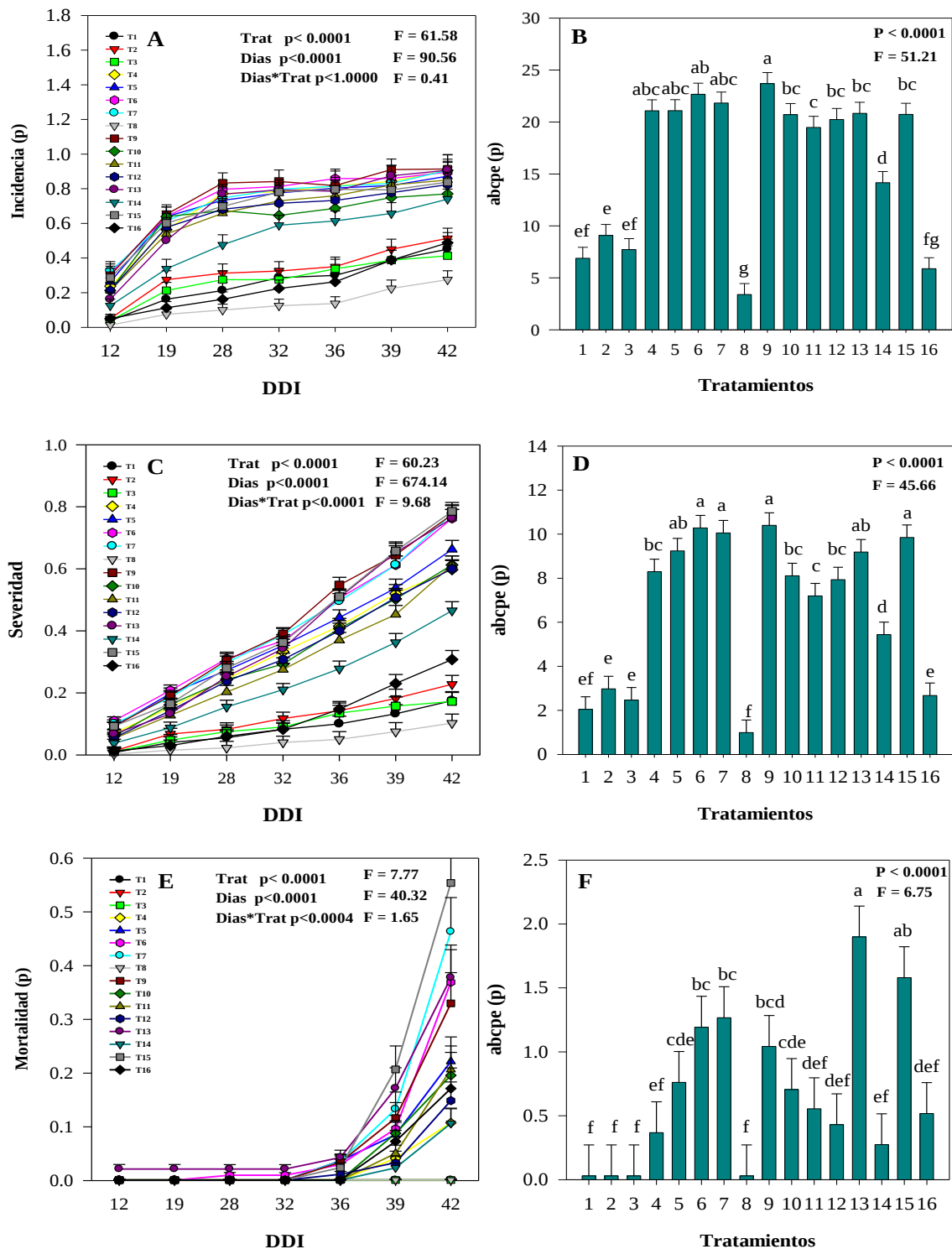


Figura 2. Efecto de tratamientos pre-transplante, pre-infección, 1= procloraz, 2= procloraz + thiram, 3= cyprodinil + fludioxonil, 4= difenoconazol + azoxystrobin, 5= iprodiona, 6= captan. 7= thiram, 8= pydiflumetofeno + fludioxonil, 9= fluxapyroxad + pyraclostrobin, 10= *T. koningiopsis*, 11= *T. asperellum*, 12= *Streptomyces* spp. 13=

B. amyloliquefaciens, 14= Testigo sin inocular, 15= Testigo inoculado, 16= hymexazol. Panel A) Incidencia de la enfermedad a través del tiempo; B) ABCPE de la incidencia; C) Severidad de la enfermedad a través del tiempo; D) ABCPE de la severidad; E) Mortalidad de la enfermedad a través del tiempo; F) ABCPE de la mortalidad.

Cuadro 2. Efecto de tratamientos pre-transplante en la incidencia, severidad y mortalidad final de plantas de fresa en aplicación pre-infección.

Trat ^z	Ingrediente activo	Inc ^y (EE)	Sev ^x (EE)	Mort (EE) ^w
1	Procloraz	0.45 (0.06) ef	0.18 (0.03) gh	0.00 (0.00) g
2	Procloraz + thiram	0.51 (0.06) e	0.23 (0.03) g	0.00 (0.00) g
3	Cyprodinil + fludioxonil	0.41 (0.06) efg	0.17 (0.03) gh	0.00 (0.00) g
4	Difenoconazol + azoxystrobin	0.91 (0.05) a	0.60 (0.03) bcd	0.11 (0.03) ef
5	Iprodiona	0.87 (0.05) a	0.66 (0.03) b	0.22 (0.05) d
6	Captan	0.90 (0.10) a	0.76 (0.03) a	0.37 (0.06) bc
7	Thiram	0.91 (0.05) a	0.78 (0.03) a	0.46 (0.06) ab
8	Pydiflumetofeno + fludioxonil	0.27 (0.05) h	0.10 (0.03) i	0.00 (0.00) g
9	Fluxapyroxad + pyraclostrobin	0.91 (0.08) a	0.78 (0.03) a	0.33 (0.06) bc
10	<i>T. koningiopsis</i>	0.77 (0.07) abc	0.61 (0.03) bc	0.20 (0.04) de
11	<i>T. asperellum</i>	0.85 (0.06) ab	0.61 (0.03) bc	0.21 (0.04) de
12	<i>Streptomyces</i> spp.	0.82 (0.06) abc	0.60 (0.03) bcd	0.15 (0.03) def
13	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.91(0.06) a	0.76 (0.03) a	0.38 (0.06) bc
14	Testigo sin inocular	0.74 (0.06) bcd	0.47 (0.03) e	0.11 (0.03) ef
15	Testigo inoculado	0.84 (0.06) ab	0.79 (0.03) a	0.55 (0.06) a
16	Hymexazol	0.49 (0.06) e	0.31 (0.03) f	0.17 (0.04) def

^z Trat, Tratamiento. ^y Inc, Incidencia. ^x Sev, Severidad. ^w Mort, Mortalidad (proporción). ^w EE, Error estándar. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P < 0.05; LSD).

En la Fig. 3 se muestra el efecto general de los tratamientos químicos y biológicos pre-infección que reflejan los valores representativos de la incidencia y severidad en plantas de fresa inoculadas con *N. rosae* 42 días después de la inoculación. Como se observa, en general, el procloraz, procloraz + thiram, cyprodinil + fludioxonil, pydiflumetofeno+ fludioxonil y el hymexazol, mantuvieron la salud de las plantas durante la duración del experimento, y permitieron que las plantas llegaran a madurez de frutos 75 a 80 DDI.



Figura 3. Efecto de tratamientos químicos y biológicos pre-infección en plantas de fresa inoculadas con *Neopestalotiopsis rosae* en condiciones de invernadero a los 42 DDI.

Peso fresco y seco. Los datos del experimento mostraron diferencias significativas para el peso fresco total ($P < 0.0001$; $F = 4.76$) y peso seco total ($P < 0.0001$; $F = 7.58$) entre tratamientos (Cuadro 3). El fungicida con mayor peso fresco y peso seco total reflejado fue, pydiflumetofeno + fludioxonil mostrando diferencias significativas con ambos controles, y con la mayoría de los tratamientos excepto con procloraz, cyprodinil + fludioxonil e hymexazol evidenciándose nuevamente como los mejores tratamientos, similar a lo mencionado en las variables incidencia, severidad y mortalidad. Los tratamientos con peso fresco y seco total intermedio fueron procloraz + thiram, *B. amyloliquefaciens*, *T. asperellum*, difenoconazol + azoxystrobin e iprodiona sin diferencias significativas con los testigos. Por lo tanto, thiram fue el tratamiento que presentó menor peso fresco y seco total de todos los tratamientos evaluados. Sin diferencias significativas con el testigo inoculado, ni con los tratamientos a base de fluxapyroxad + pyraclostrobin, *T. koningiopsis*, *Streptomyces* spp. y captan.

Por otro lado, se realizó la evaluación del peso fresco y seco de las plantas en dos secciones; área foliar y área radical por lo que, los datos del experimento mostraron diferencia significativa ($P < 0.0001$; $F = 10.42$), ($P < 0.0033$; $F = 2.50$), ($P < 0.0001$; $F = 17.09$), ($P < 0.0006$; $F = 2.93$) para cada una de las secciones (Cuadro 3). Lo que evidencia que una raíz sana se refleja en mayor área foliar y sanidad de la planta. Los fungicidas Pydiflumetofeno + fludioxonil, procloraz + thiram, cyprodinil + fludioxonil, procloraz e hymexazol fueron los tratamientos que mayor peso foliar y radical presentaron en ambas secciones para el peso fresco y seco, evidenciando diferencias significativas con los testigos en la parte foliar, no así en la parte radical. Sin embargo, cabe mencionar que de estos tratamientos hymexazol, procloraz y pydiflumetofeno + fludioxonil presentaron mayor biomasa radical. Los tratamientos a base de iprodiona, *T. asperellum*, *B. amyloliquefaciens*, difenoconazol + azoxystrobin, *Streptomyces* spp., thiram, *T. koningiopsis*, fluxapyroxad + pyraclostrobin y captan evidenciaron menor biomasa aérea fresca y seca, así como menor peso radical comparado con los tratamientos anteriores (Cuadro 3), siendo el captan el que presentó menor biomasa foliar, sin diferencias significativas con el testigo inoculado.

Longitud de raíz. Para esta variable se observó diferencias significativas ($P < 0.0001$; $F = 17.54$) entre tratamientos (Cuadro 3). El cyprodinil + fludioxonil, pydiflumetofeno + fludioxonil y procloraz resultaron con los valores más altos de longitud de raíz, con esto se demuestra que una raíz sana se refleja en el desarrollo de la planta y a su vez en la sanidad general. Le siguieron los tratamientos a base de procloraz + thiram, hymexazol y *T. asperellum*, sin diferencias significativas con el testigo sin inocular confirmando lo mencionado en la variable anterior. Difenconazol + azoxystrobin, iprodiona, *Streptomyces* spp., *B. amyloliquifaciens*, captan, thiram, *T. koningiopsis* y Fluxapyroxad + pyraclostrobin, no mostraron diferencias significativas con el testigo inoculado, resultando en la menor longitud de raíz. Siendo este último quien presentó los valores más bajos comparado con todos los tratamientos.

Cuadro 3. Peso fresco, peso seco y longitud de raíz de plantas de fresa con los tratamientos aplicados pre-transplante y pre-infección.

Trat ^z	Ingrediente activo	Peso Fresco Foliar (g, EE) ^y	Peso Fresco Radical (g, EE)	Peso Fresco Total (g, EE)	Peso Seco Foliar (g, EE)	Peso Seco Radical (g, EE)	Peso Seco Total (g, EE)	Longitud de Raíz (cm, EE)
1	Procloraz	3.76 (0.47) b ^x	4.42 (0.66) b	8.18 (1.06) a	1.02 (0.11) bc	1.59 (0.16) abc	2.61 (0.25) ab	31.95 (1.51) a
2	Procloraz + thiram	3.88 (0.47) b	3.43 (0.66) bcd	7.31 (1.06) ab	1.19 (0.11) b	1.25 (0.16) abcd	2.44 (0.25) bc	25.18 (1.51) bc
3	Cyprodinil + fludioxonil	3.78 (0.47) b	3.62 (0.66) bcd	7.39 (1.06) ab	1.17 (0.11) b	1.57 (0.16) abc	2.75 (0.25) ab	28.98 (1.51) ab
4	Difenoconazol + azoxystrobin	1.05 (0.47) de	3.49 (0.66) bcd	4.55 (1.06) bc	0.33 (0.11) ef	1.21 (0.16) bcd	1.54 (0.25) de	17.65 (1.51) de
5	Iprodiona	1.43 (0.47) de	2.65 (0.66) bcd	4.08 (1.06) c	0.39 (0.11) ef	0.97 (0.16) de	1.35 (0.25) de	17.12 (1.51) e
6	Captan	0.47 (0.47) e	2.57 (0.66) bcd	3.04 (1.06) c	0.22 (0.11) f	1.10 (0.16) de	1.32 (0.25) de	15.28 (1.51) ef
7	Thiram	0.82 (0.47) de	1.99 (0.66) d	2.81 (1.06) c	0.28 (0.11) f	0.75 (0.16) e	1.02 (0.25) e	15.59 (1.51) ef
8	Pydiflumetofeno + fludioxonil	5.21 (0.47) a	4.31 (0.66) bc	9.51 (1.06) a	1.62 (0.11) a	1.63 (0.16) ab	3.25 (0.25) a	31.13 (1.51) a
9	Fluxapyroxad + pyraclostrobin	0.51 (0.47) e	2.89 (0.66) bcd	3.40 (1.06) c	0.18 (0.11) f	1.04 (0.16) de	1.23 (0.25) de	12.09 (1.51) f
10	<i>T. koningiopsis</i>	0.57 (0.47) e	2.76 (0.66) bcd	3.33 (1.06) c	0.18 (0.11) f	1.01 (0.16) de	1.19 (0.25) de	15.24 (1.51) ef
11	<i>T. asperellum</i>	1.18 (0.47) de	3.41 (0.66) bcd	4.59 (1.06) bc	0.47 (0.11) def	1.15 (0.16) cde	1.61 (0.25) de	21.38 (1.51) cd
12	<i>Streptomyces</i> spp.	0.83 (0.47) de	2.54 (0.66) cd	3.37 (1.06) c	0.26 (0.11) f	1.00 (0.16) de	1.26 (0.25) de	16.56 (1.51) e
13	<i>B. amyloliquefaciens</i>	1.01 (0.47) de	3.98 (0.66) bc	4.99 (1.06) bc	0.28 (0.11) f	1.37 (0.16) abcd	1.65 (0.25) de	15.64 (1.51) ef
14	Testigo sin inocular	1.98 (0.47) cd	3.16 (0.66) bcd	5.14 (1.06) bc	0.59 (0.11) de	1.23 (0.16) bcd	1.82 (0.25) cd	24.93 (1.51) bc
15	Testigo inoculado	1.08 (0.47) de	2.59 (0.66) bcd	3.67 (1.06) c	0.31 (0.11) ef	0.97 (0.16) de	1.28 (0.25) de	15.27 (1.51) ef
16	Hymexazol	3.23 (0.47) bc	6.37 (0.66) a	9.60 (1.06) a	0.76 (0.11) cd	1.70 (0.16) a	2.46 (0.25) bc	23.00 (1.51) c

^z Trat, Tratamientos.

^y EE, Error estándar

^x Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (P < 0.05; LSD).

3.3.2. Efecto de tratamientos al trasplante en post-infección

Incidencia de la enfermedad. Los datos del experimento mostraron que la interacción entre el tiempo y los tratamientos fueron estadísticamente significativa ($P < 0.0001$; $F = 2.36$), indicando que el efecto de los tratamientos cambió en función del tiempo, además hubo diferencias significativas ($P < 0.0965$; $F = 1.55$) entre los factores principales (tiempo y tratamientos) (Fig. 4A). En general el comportamiento de la enfermedad fue similar mostrando la misma tendencia, pero con valores diferentes entre los tratamientos. Respecto a procloraz + thiram, inició con un nivel intermedio de incidencia en comparación con los demás tratamientos; por lo que, 33 DDI, la tendencia de la incidencia bajo ligeramente siendo el mejor tratamiento al final del experimento, seguido por procloraz e hymexazol, sin embargo, no fue el tratamiento que presentó menor ABCPE, por lo tanto, no hubo diferencias significativas en contraste con los testigos (Fig. 4B), además, no hubo diferencias significativas ($P < 0.1472$; $F = 1.43$), dentro de este parámetro entre tratamientos. Los tratamientos a base de captan, cyprodinil + fludioxonil, pydiflumetofeno + fludioxonil, difenoconazol + azoxystrobin y thiram, a partir del día 27 DDI, su tendencia fue muy similar, sin embargo, cyprodinil + fludioxonil presentó valores más bajos a partir de ese día y hasta los 42 DDI, siendo el captan quien presentó menor ABCPE comparado con todos los tratamientos. En el caso de iprodiona, fluxapyroxad + pyraclostrobin y *Streptomyces* spp. de los 20 a los 24 DDI, comenzaron con incidencia baja, pero, a partir del día 24 y 27 DDI, se incrementó, manteniendo una constante con altibajos hasta los 43 DDI, por lo que iprodiona presentó una incidencia final del 70 % (Cuadro 4), además, fue el tratamiento que mayor ABCPE presentó, en comparación con todos los tratamientos, incluso superior a los testigos (Fig. 4B). En cuanto a los tratamientos a base de microorganismos biológicos como *B. amyloliquefaciens*, *T. koningiopsis* y *T. asperellum*, demostraron una tendencia elevada durante los días evaluados, siendo las aplicaciones a base de *T. koningiopsis* quien presentó mayor incidencia final (Cuadro 4), comparado con todos los tratamientos a partir de los 33 DDI, sin embargo, para el día 43 DDI, no hubo diferencias significativas en contraste con

Streptomyces spp. y fluxapyroxad + pyraclostrobin ni con el control inoculado (Fig. 4A).

Severidad de la enfermedad. Los datos de la severidad mostraron que la interacción entre el tiempo y los tratamientos fue significativa ($P < 0.0001$; $F = 2.90$) por lo que, el efecto de los tratamientos cambió en función del tiempo similar a la incidencia. Las evaluaciones se comenzaron a tomar 20 DDI, sin diferencia significativa entre tratamientos, el control inoculado mantuvo una tendencia creciente a lo largo del tiempo, diferenciándose con el control no inoculado (Fig. 4C). A partir de los 27 DDI, los tratamientos comenzaron a diferenciarse por lo que, hymexazol presentó una severidad baja, sin embargo, para el día 30 DDI se incrementó ligeramente, presentando valores similares a thiram el cual mantuvo una tendencia durante las próximas evaluaciones y hasta el final del experimento en comparación con los demás tratamientos, siendo el mejor con una severidad final inferior a los demás, por lo que, el análisis de la severidad final presentó diferencias significativas ($P < 0.0001$; $F = 4.65$), entre tratamientos (Cuadro 4). Además, los datos del análisis de varianza del ABCPE ($P < 0.0775$; $F = 1.63$; Fig. 4D) evidenciaron que dichos tratamientos junto con captan, mantuvieron las plantas con nivel bajo de la enfermedad mostrando diferencias significativas con el control inoculado. Los tratamientos con severidad intermedia a través del tiempo fueron procloraz + thiram, hymexazol, difenoconazol + azoxystrobin, cyprodinil + fludioxonil, procloraz y captan sin diferencias significativas entre ellos ni con el control sin inocular. De igual manera coinciden con el parámetro ABCPE (Fig. 4D) y la severidad final (Cuadro 4). Posteriormente, *T. asperellum* y fluxapyroxad + pyraclostrobin tuvieron un comportamiento similar a partir de los 30 DDI, sin diferencias significativas con el testigo inoculado. En general el comportamiento más evidenciado fue el de *Streptomyces* spp. ya que de los 20 a los 24 DDI, fue el tratamiento que menos severidad presentaba, sin embargo, a partir los 24 a los 43 DDI, se incrementó considerablemente, siendo, el tratamiento con mayor severidad superior al testigo inoculado reflejándose en la severidad final (Cuadro 4). Otros tratamientos como iprodiona, *B. amyolliquefaciens* y *T. koningiopsis* no presentaron diferencias significativas en comparación con el control inoculado durante los días

evaluados (Fig. 4C), considerándose como tratamientos con severidad final y ABCPE alta (Fig. 4D).

Mortalidad de la enfermedad. Los datos del experimento indicaron diferencias significativas ($P < 0.0005$; $F = 1.63$; Fig. 4E), entre la interacción tratamientos, indicando que el efecto de los tratamientos varió dependiendo del tiempo de evaluación, similar a la incidencia y severidad. En este caso fue evidente que la mortalidad en el tratamiento a base de fluxapyroxad + pyraclostrobin inició a partir del día 20 DDI, de los 20 a los 30 DDI, no hubo diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, fluxapyroxad + pyraclostrobin presentó valores ligeramente más elevados de mortalidad en el rango de los días mencionados. De los 30 a los 33 DDI, se incrementó la mortalidad someramente de algunos tratamientos como; fluxapyroxad + pyraclostrobin y procloraz + thiram. No obstante, a partir de los 33 DDI, se incrementó la mortalidad de plantas por la enfermedad considerablemente hasta los 43 DDI, diferenciándose todos los tratamientos. Por lo que, el fungicida thiram a partir de los 33 DDI fue incrementando la mortalidad, pero con tendencia baja comparado con el resto de los tratamientos por lo tanto, fue quien presentó menor mortalidad final (Cuadro 4) y menor ABCPE (Fig. 4F), seguido por procloraz + thiram, procloraz e hymexazol, junto con los tratamientos, difenoconazol + azoxystrobin, cyprodinil + fludioxonil y pydiflumetofeno + fludioxonil en el que la mortalidad se incrementó de los 39 a 43 DDI, comparado con el tratamiento anterior, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre ellos, pero si con el control inoculado. Las aplicaciones a base de captan, *T. asperellum*, iprodiona, fluxapyroxad + pyraclostrobin y *T. koningiopsis*, presentaron una mortalidad intermedia sin diferencias significativas con los testigos. Por otro lado, los tratamientos que continuaron con una tendencia creciente fueron *B. amyloliquefaciens* y *Streptomyces* spp., siendo los tratamientos con mayor mortalidad a partir de los 39 a 43 DDI presentando valores superiores comparados con el control inoculado al final del experimento (Cuadro 4) y mayor ABCPE (Fig. 4F).

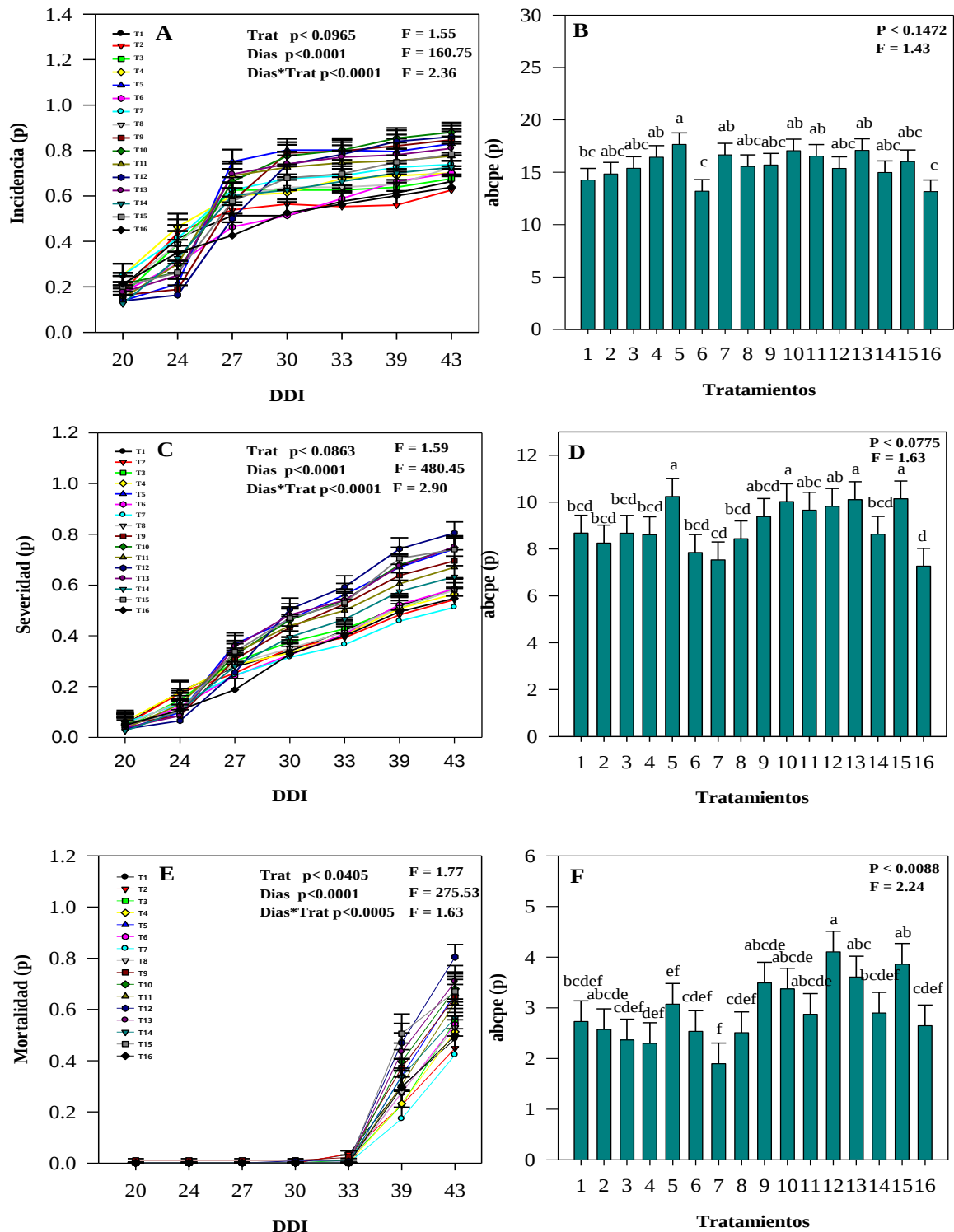


Figura 4. Efecto de tratamientos post-transplante post-infección, 1= procloraz, 2= procloraz + thiram, 3= cyprodinil + fludioxonil, 4= difenoconazol + azoxystrobin, 5= iprodiona, 6= captan, 7= thiram, 8= pydiflumetofeno + fludioxonil, 9= fluxapyroxad + pyraclostrobin, 10= *T. koningiopsis*, 11= *T. asperellum*, 12= *Streptomyces* spp. 13=

B. amyloliquefaciens, 14= Testigo sin inocular, 15= Testigo inoculado, 16= hymexazol. Panel A) Incidencia de la enfermedad a través del tiempo; B) ABCPE de la incidencia; C) Severidad de la enfermedad a través del tiempo; D) ABCPE de la severidad; E) Mortalidad de la enfermedad a través del tiempo; F) ABCPE de la mortalidad.

Cuadro 4. Efecto de los tratamientos post-transplante en la incidencia, severidad y mortalidad final de plantas de fresa en aplicación post-infección.

Trat ^z	Ingrediente activo	Inc ^y (EE)	Sev ^x (EE)	Mort (EE) ^w
1	Procloraz	0.66 (0.06) def*	0.58 (0.04) bcd	0.48 (0.08) def
2	Procloraz + thiram	0.63 (0.06) defg	0.54 (0.04) de	0.45 (0.08) f
3	Cyprodinil + fludioxonil	0.68 (0.06) cdef	0.58 (0.04) bcd	0.55 (0.07) bcde
4	Difenoconazol + azoxystrobin	0.70 (0.05) cde	0.57 (0.04) cd	0.51 (0.08) def
5	Iprodiona	0.83 (0.05) ab	0.74 (0.04) ab	0.66 (0.07) abc
6	Captan	0.70 (0.05) cde	0.59 (0.04) bcd	0.54 (0.08) cdef
7	Thiram	0.74 (0.05) bcd	0.51 (0.04) def	0.42 (0.07) fg
8	Pydiflumetofeno + fludioxonil	0.73 (0.05) cd	0.58 (0.04) bcd	0.53 (0.08) cdef
9	Fluxapyroxad + pyraclostrobin	0.85 (0.05) ab	0.70 (0.04) b	0.65 (0.07) bcd
10	<i>T. koningiopsis</i>	0.88 (0.04) a	0.75 (0.04) ab	0.68 (0.07) abc
11	<i>T. asperellum</i>	0.78 (0.05) bc	0.67 (0.04) b	0.63 (0.07) bcde
12	<i>Streptomyces</i> spp.	0.86 (0.05) ab	0.81 (0.04) a	0.80 (0.05) a
13	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.81 (0.05) abc	0.75 (0.04) ab	0.71 (0.06) ab
14	Testigo sin inocular	0.73 (0.05) cd	0.63 (0.04) bc	0.57 (0.07) cdef
15	Testigo inoculado	0.78 (0.06) abc	0.74 (0.04) ab	0.67 (0.07) bcde
16	Hymexazol	0.64 (0.06) def	0.55 (0.04) cde	0.50 (0.08) ef

^z Trat, Tratamiento. ^y Inc, Incidencia. ^x Sev, Severidad. ^w Mort, Mortalidad (proporción). ^w EE, Error estándar. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05; LSD).

En la figura 5 se muestra el efecto general de los tratamientos químicos y biológicos aplicados post-infección que reflejan los valores representativos de la incidencia y severidad en plantas de fresa inoculadas con *N. rosae* 43 DDI.

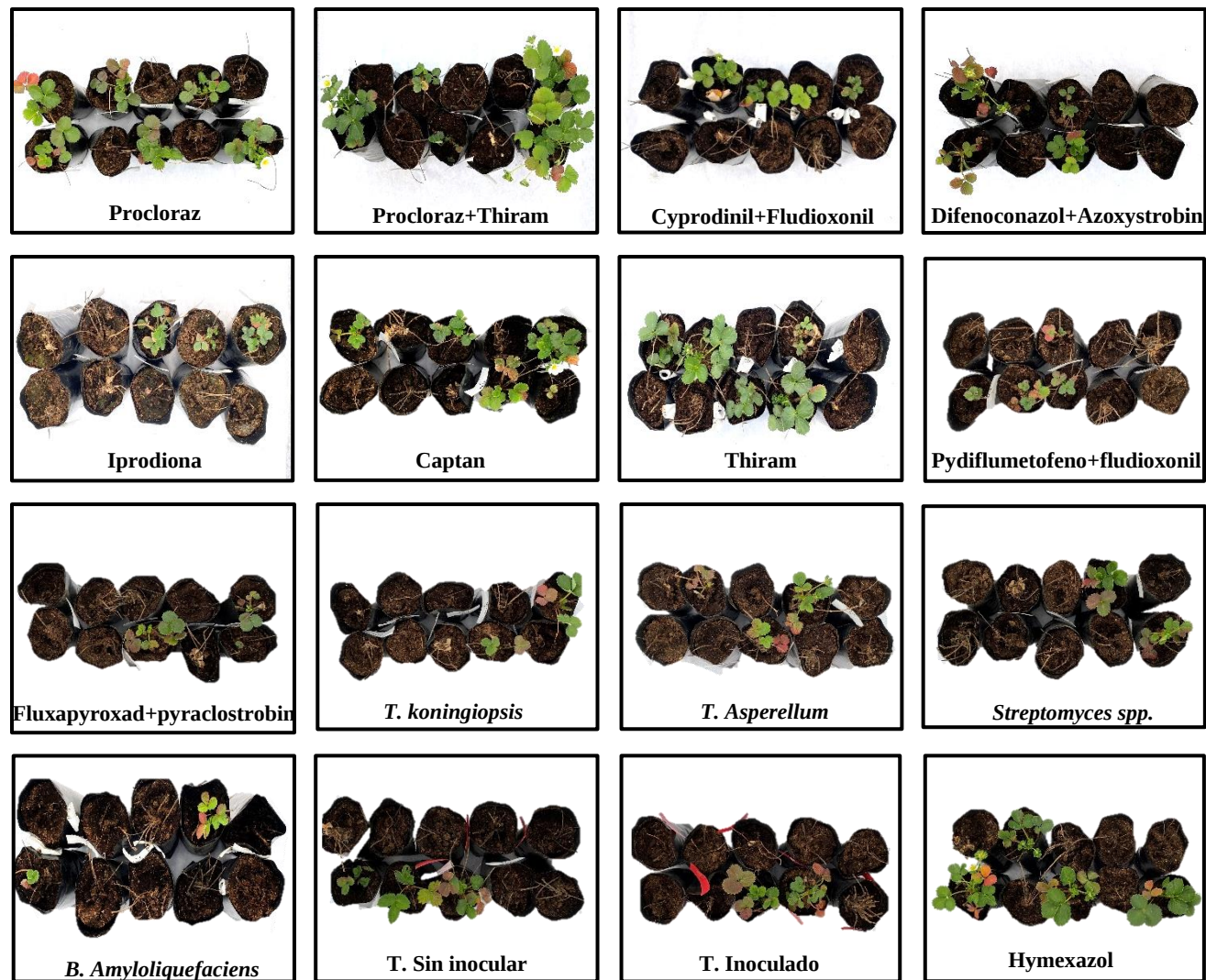


Figura 5. Efecto de tratamientos químicos y biológicos post-infección en plantas de fresa inoculadas con *Neopestalotiopsis rosae* en condiciones de invernadero a los 43 DDI.

Peso fresco y seco. Los resultados del experimento mostraron diferencias significativas para el peso fresco total ($P < 0.0001$; $F = 4.16$) y peso seco total ($P < 0.0432$; $F = 1.80$) entre tratamientos (Cuadro 5). Hymezaxol fue el único tratamiento que mostró diferencias significativas con los testigos y con los tratamientos evaluados presentando mayor biomasa fresca y seca total, evidenciándose como el mejor tratamiento. Por lo tanto, el resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí, ni con respecto a los controles, pero, si hubo diferencias en cuanto a los valores presentados siendo, *T. asperellum*, difenoconazol + azoxystrobin, procloraz + thiram, captan, procloraz, cyprodinil + fludioxonil, y fluxapyroxad + pyraclostrobin, los que presentaron valores intermedios (Cuadro 5). Por lo que, iprodiona fue quien presentó los valores más bajos de biomasa total reflejada en las plantas.

Por otro lado, se realizó la evaluación del peso fresco y seco de las plantas en dos secciones; área foliar y área radical por lo que, los datos del experimento mostraron diferencia significativa ($P < 0.0001$; $F = 3.93$), ($P < 0.0001$; $F = 3.95$), ($P < 0.0033$; $F = 2.50$), ($P < 0.1152$; $F = 1.51$) para cada una de las secciones (Cuadro 5). El hymexazol fue el tratamiento que mayor biomasa aérea y radical presentó, evidenciando diferencias significativas con el resto de los tratamientos y con los controles. Los fungicidas, pydiflumetofeno + fludioxonil, procloraz + thiram, procloraz, *T. asperellum*, thiram, captan, difenoconazol + azoxystrobin, cyprodinil + fludioxonil y fluxapyroxad + pyraclostrobin mostraron valores intermedios de biomasa aérea y radical sin diferencias significativas con los testigos. Por lo tanto, iprodiona fue quien presentó los valores más bajos de biomasa aérea y radical lo que evidencia, que una raíz enferma se ve reflejada en el área foliar y por ende en la biomasa total de la planta.

Longitud de raíz. Los datos del experimento mostraron diferencias significativas ($P < 0.0143$; $F = 2.11$), entre tratamientos (Cuadro 5). Los datos promedio obtenidos evidenciaron que la aplicación basada en hymexazol presentó mayor longitud de raíz, reflejando diferencias significativas con todos los tratamientos y los testigos incluidos corroborando que fue el mejor tratamiento. Le siguen las aplicaciones

basadas en procloraz, *T. asperellum* y *T. koningiopsis* sin diferencias significativas con el testigo inoculado y testigo sin inocular. Iprodiona reflejo menor longitud de raíz mostrando diferencias significativas con el testigo sin inocular, no así en comparación con el testigo inoculado.

Cuadro 5. Peso fresco, peso seco, y longitud de raíz en los tratamientos aplicados post-transplante y post-infección de plantas de fresa.

Trat ^z	Ingrediente activo	Peso Fresco Foliar (g, EE) ^y	Peso Fresco Radical (g, EE)	Peso Fresco Total (g, EE)	Peso Seco Foliar (g, EE)	Peso Seco Radical (g, EE)	Peso Seco Total (g, EE)	Longitud de Raíz (cm, EE)
1	Procloraz	0.71 (0.16) bc	1.80 (0.41) b	2.51 (0.55) b	0.34 (0.06) abc	1.27 (0.17) abc	1.60 (0.21) abcde	15.73 (1.2) bcd
2	Procloraz + thiram	0.73 (0.16) b	1.55 (0.41) b	2.28 (0.55) b	0.35 (0.06) ab	1.19 (0.17) abc	1.55 (0.21) abcde	13.55 (1.2) bcd
3	Cyprodinil + fludioxonil	0.55 (0.16) bcd	1.95 (0.41) b	2.50 (0.55) b	0.26 (0.06) bcde	1.41 (0.17) abc	1.67 (0.21) abcd	14.69 (1.2) bcd
4	Difenoconazol + azoxystrobin	0.50 (0.16) bcd	1.62 (0.41) b	2.12 (0.55) b	0.25 (0.06) bcde	1.29 (0.17) abc	1.54 (0.21) abcd	13.75 (1.2) bcd
5	Iprodiona	0.25 (0.16) d	1.32 (0.41) b	1.57 (0.55) b	0.10 (0.06) e	0.97 (0.17) c	1.07 (0.21) e	12.75 (1.2) d
6	Captan	0.47 (0.16) bcd	1.80 (0.41) b	2.26 (0.55) b	0.27 (0.06) bcde	1.32 (0.17) abc	1.59 (0.21) abcde	13.87 (1.2) bcd
7	Thiram	0.52 (0.16) bcd	1.57 (0.41) b	2.10 (0.55) b	0.28 (0.06) bcd	1.27 (0.17) abc	1.55 (0.21) abcde	13.95 (1.2) bcd
8	Pydiflumetofeno + fludioxonil	0.38 (0.16) bcd	1.54 (0.41) b	1.91 (0.55) b	0.13 (0.06) de	1.00 (0.17) c	1.12 (0.21) de	12.96 (1.2) cd
9	Fluxapyroxad + pyraclostrobin	0.45 (0.16) bcd	2.12 (0.41) b	2.56 (0.55) b	0.24 (0.06) bcde	1.47 (0.17) ab	1.71 (0.21) abc	13.74 (1.2) bcd
10	<i>T. koningiopsis</i>	0.29 (0.16) bcd	1.48 (0.41) b	1.77 (0.55) b	0.12 (0.06) de	1.06 (0.17) bc	1.18 (0.21) cde	15.96 (1.2) bc
11	<i>T. asperellum</i>	0.35 (0.16) bcd	1.53 (0.41) b	1.88 (0.55) b	0.19 (0.06) bcde	1.28 (0.17) abc	1.47 (0.21) bcde	15.92 (1.2) bcd
12	<i>Streptomyces</i> spp.	0.32 (0.16) bcd	1.33 (0.41) b	1.66 (0.55) b	0.16 (0.06) cde	1.09 (0.17) bc	1.25 (0.21) bcde	14.96 (1.2) bcd
13	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0.25 (0.16) cd	1.22 (0.41) b	1.48 (0.55) b	0.12 (0.06) de	0.98 (0.17) c	1.10 (0.21) de	14.61 (1.2) bcd
14	Testigo sin inocular	0.44 (0.16) bcd	2.04 (0.41) b	2.48 (0.55) b	0.21 (0.06) bcde	1.56 (0.17) a	1.77 (0.21) ab	16.24 (1.2) b
15	Testigo inoculado	0.36 (0.16) bcd	1.44 (0.41) b	1.80 (0.55) b	0.19 (0.06) bcde	1.10 (0.17) bc	1.29 (0.21) bcde	14.48 (1.2) bcd
16	Hymexazol	1.59 (0.16) a	4.69 (0.41) a	6.28 (0.55) a	0.47 (0.06) a	1.59 (0.17) a	2.06 (0.21) a	19.48 (1.2) a

^z Trat, Tratamientos.

^y EE, Error estándar

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($P < 0.05$; LSD).

3.4. DISCUSIÓN

La pudrición de corona, raíz y tizón foliar, ocasionado por *N. rosae*, ha originado severos daños, convirtiéndose en una limitante para la producción del cultivo de fresa en las principales zonas productoras a nivel mundial. Hasta ahora, el manejo de la enfermedad ha sido poco efectivo, en especial para reducir los síntomas de pudrición de raíz y corona, debido a que el agente causal se puede dispersar fácilmente a las parcelas comerciales mediante plántulas infectadas (Rebollar-Alviter et al. 2020). Los tratamientos pre-transplante resultan obligatorios, ya que prácticamente ningún vivero está libre de la enfermedad, lo que dificulta el manejo de esta dada la presencia de infecciones primarias en las plántulas.

Este estudio evidenció la existencia de productos que aplicados en pre-transplante, pueden evitar o retardar el desarrollo de la enfermedad, permitiendo que las plantas lleguen a producción reduciendo significativamente las pérdidas de plántula o la muerte posterior de las plantas. Además, este estudio demostró que el tratamiento pre-transplante y una segunda aplicación a los 8 días con pydiflumetofeno + fludioxonil, procloraz, cyprodinil + fludioxonil o hymexazol resultaron como los más efectivos en la reducción de la intensidad de la enfermedad (incidencia, severidad y mortalidad). Dichos tratamientos, pospusieron el inicio de la enfermedad y además tuvieron la menor mortalidad al final del estudio. Estos tratamientos, además permitieron que las plantas llegaran a la madurez de los frutos, prácticamente sin síntomas o muy ligeros. La eficacia de estos, también se vio reflejada en una mayor biomasa radical y foliar, longitud de raíz y en general mayor biomasa total presente en plantas más saludables, sobresaliendo entre ellos el pydiflumetofeno + fludioxonil. Este último fungicida, ha sido previamente reportado como efectivo en el control de la mancha foliar y frutos de la fresa por *Neopestalotiopsis* sp. (Baggio et al. 2020), pero no se había probado como preventivo en pre-transplante para control de la pudrición de corona causada por *N. rosae* mostrando en este estudio una eficacia del 67 % en la incidencia, 86 % en la severidad y 99 % en la mortalidad final de las plantas. Este estudio demuestra por primera vez, la eficacia de dichos tratamientos aplicados de manera preventiva en

pre-transplante. El pydiflumetofeno inhibe el complejo II dentro de la membrana mitocondrial que actúa sobre la enzima succinato deshidrogenasa, la cual está involucrada en la catálisis de reacción en el ciclo de Krebs, en la glucólisis y la fosforilación oxidativa, ya que en estos procesos se produce energía a partir de la glucosa (Moosavi et al. 2019); por lo que, la actividad del ingrediente activo actúa en el inicio del desarrollo del patógeno etapa en la que requiere mayor energía para la producción del tubo germinativo y en la etapa de producción de conidios. Por otra parte, el fludioxonil inhibe la acción de la enzima histidina quinasa involucrada en la traducción de señales produciendo malformación de hifas e hinchazón (Oiki et al. 2022). Con base en lo anterior posiblemente esa es la respuesta del porque el efecto del producto presentó menos efectos negativos de manera preventiva que curativa en general en todas las variables. La combinación de fungicidas pydiflumetofeno + fludioxonil también se han evaluado contra *Botrytis cinerea* en el que se observa una inhibición de la germinación de los conidios (He et al. 2020).

Por otro lado, procloraz y cyprodinil + fludioxonil son una alternativa que se puede utilizar para el control de la pudrición de la corona causada por *N. rosae* ya que presentaron efectos positivos para su control de forma preventiva, retardando el avance de la enfermedad lo que se reflejó en una baja incidencia, severidad y mortalidad. Aunque estos tratamientos redujeron significativamente la intensidad de la enfermedad de forma preventiva, su efecto se vio claramente reducido cuando se aplicaron de manera curativa (post-infección; post-transplante). McQuilken y Hopkins (2004), reportaron efectos favorables de procloraz en alternancia con carbendazim reduciendo la incidencia del oscurecimiento foliar de *Calluna vulgaris* causada por *Pestalotiopsis sydowniana*. Bin et al. (2013), indicaron que procloraz inhibió el crecimiento *in vitro* de *P. microspora* en 71.11 % y una eficacia en campo del 75.62% similar a los valores obtenidos en esta investigación que fueron del 77.69 % en la severidad de la enfermedad final. Por su parte, Wen et al. (2019) indicaron que procloraz fue eficaz para el control del crecimiento micelial de *N. clavispora*, *in vitro*. El procloraz también se evaluó contra el crecimiento micelial *in vitro* de *N. rosae*, inhibiendo el 100 % del crecimiento micelial (Rebollar-Alviter et al. 2020) y contra *Fusarium* spp. en plátano con una reducción del 78 % de la severidad

(Nel et al. 2007), además se ha informado sus efectos favorables en tomate (Amini y Sidovich 2010) y zarzamora (Hernández-Cruz et al. 2020; Acosta-González et al. 2021). De acuerdo con Tejada et al. (2011), el procloraz muestra además otros efectos como, aumento de la actividad enzimática de bacterias ya que probablemente estas lo utilizan como fuente de energía y nutrientes, aparte de inhibir la síntesis del ergosterol que es un componente esencial en la membrana celular de los hongos.

Por otro lado, los resultados que obtuvo Baggio et al. (2020), referente a cyprodinil + fludioxonil contra *Neopestalotiopsis* sp. en frutos de fresa fueron superiores a los de este estudio, sin embargo, no se había probado contra *N. rosae* causando pudrición de corona. Cabe mencionar que tanto cyprodinil + fludioxonil y pydiflumetofeno + fludioxonil deben usarse con precaución, ya que su compuesto similar (fludioxonil) muestra falta de eficacia en algunos estudios (Suginoshita et al. 2022) pudiendo desarrollar resistencia en hongos.

Con relación a tratamientos como el captan, thiram, fluxapiraxad + pyraclostrobin, iprodiona y difenoconzol + azoxystrobin, resultaron con un efecto intermediode manera preventiva, caso contrario de manera curativa para thiram, captan aunado procloraz + thiram e hymexazol. Aunque, Essa et al. (2018) reportaron que el thiram fue efectivo para el control de la pudrición de la corona por *N. rosae*, nuestros estudios indicaron que en general este fungicida tuvo un efecto de medio a bajo, similar a iprodiona. Los mismos autores indicaron que el thiram e hymexazol aplicados después de la inoculación, redujeron la incidencia de la pudrición de raíz y corona en plantas de fresa en las variedades Fortuna y Festival ocasionada por *N. rosae* en 80-82.05 y 79.09 % para cada tratamiento con una ligera variación en el thiram para cada variedad. Además, también evaluaron la mezcla de carboxim + thiram en la que obtuvieron una eficacia de 61.39 % en la variedad fortuna y 55.63 % en la variedad festival. En este estudio la mezcla procloraz + thiram resultó en una eficacia del 71.01 % de forma preventiva y 26.68 % de manera curativa. Por su parte, Baggio et al. (2020), mencionan que thiram resultó en solo 13 % de incidencia de la pudrición de frutos en fresa ocasionada por *Neopestalotiopsis* sp. Sin

embargo, las aplicaciones realizadas en la investigación anterior fueron de manera preventiva. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en esta investigación pesar de que los resultados de manera curativa fueron los mejores, dichas variaciones se pueden atribuir a la variedad utilizada y órgano inoculado. Por otro lado, los resultados de incidencia y severidad final del captan de manera curativa en esta investigación presentaron una eficacia baja y de manera preventiva la eficacia fue de 10 y 20 % en la incidencia y severidad de la enfermedad respectivamente. Obregón et al. (2018), demostraron que captan inhibió el crecimiento micelial de *N. clavispora* en un 30 %, mientras que, Rebollar-Alviter et al. (2020), mencionan que captan inhibió en un 100 % el crecimiento micelial de *N. rosae*. Sin embargo, en planta, la eficacia se redujo significativamente, tanto de manera preventiva como curativa, además captan y thiram evidenciaron menor biomasa total en ambos experimentos. Por lo que, hymexazol de forma curativa fue quien evidenció mayor biomasa aérea, radical y total, así como mayor longitud radical. Hymexazol es un fungicida sistémico que inhibe la síntesis del ADN y ARN, inhibe la germinación de esporas, se ha utilizado principalmente para controlar ciertas enfermedades como el marchitamiento ocasionado por *Fusarium* sp. (Myresiotis et al. 2012). Este fungicida puede ser absorbido por las raíces y transformase en dos glucósidos; O-glucósido con actividad fungitóxico referente al sitio de acción y N-glucósido como promotor del crecimiento de plantas (Zhang et al. 2021). Lo que sería el fundamento del resultado en esta investigación en las variables mencionadas.

Con relación al fluxapyroxad + pyraclostrobin resultó ser el menos efectivo de manera preventiva y de forma curativa no fue el de mayor enfermedad, sin embargo, si se encontró entre los más altos donde se evidencio mayor enfermedad. Resultados *in vitro* obtenidos por Rebollar-Alviter et al. (2020), demostraron que fluxapyroxad + pyraclostrobin ¿redujo el crecimiento de *N. rosae* con un porcentaje intermedio de inhibición de 87.50%. En estudios donde se ha evaluado el fluxapiroxad como inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa por sí solo, se ha encontrado resistencia en hongos como *Botrytis cinerea* (Veloukas et al. 2013; Amiri et al. 2014; Fernadez-ortuño et al. 2017), *Alternaria alternata* (Yang et al.

2015), *Sclerotinia homeocarpa* (Popko et al. 2018). También se ha demostrado que *Botrytis cinerea* ha presentado resistencia a pyraclostrobin (Fernandez-ortuño et al. 2016). Los resultados obtenidos en este estudio indican que fluxapyroxad + pyraclostrobin no son efectivos contra la pudrición de corona causada por *N. rosae*. junto con este fungicida, el producto formulado a base de *B. amyloliquefaciens* fue de los menos efectivos, tanto en pre-transplante preventivo, como post-transplante curativo. Sin embargo, se ha reportado *B. amyloliquefaciens* con efectos favorables inhibiendo la germinación de *F. oxysporum* (Chen et al. 2018), dañando la pared y membrana celular de *F. graminearum* (Gong et al. 2015). También se ha reportado a *B. amyloliquefaciens* inhibiendo el desarrollo de *Cladosporium cucumerinum*, *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* con efectos diferentes (Cawoy et al. 2015), además, los mismos autores mencionan que la acción fungicida varía dependiendo de la especie con la que se esté enfrentando y de la producción de lipopéptidos como las surfactinas que están involucradas en la inducción de resistencia (ISR), las iturinas y fengicina que tienen una correlación antifúngica (Dang et al. 2019; Lin et al. 2020). interfiriendo en los procesos intracelulares de los hongos.

Por otro lado, difenoconazol + azoxystrobin se mantuvo de manera general en ambos experimentos dentro de los tratamientos con eficacia intermediaa. En evaluaciones sobre la aplicación de azoxystrobin por sí solo se obtuvo una reducción de síntomas foliares en fresa en un 56.3 % ocasionados por *P. longisetula* (Carrie-Missio et al. 2010). En otras investigaciones realizadas *in vitro* se ha evidenciado un 75.67 % de inhibición de *N. clavispora* cuando se expuso a difenoconazol + azoxystrobin (Obregón et al. 2018). Aunque en evaluaciones, por separado de los ingredientes activos se obtuvo el 100 % de inhibición de *N. rosae* con difenoconazol y 79.4 % con azoxystrobin bajo condiciones *in vitro*; sin embargo, en planta, los resultados fueron diferentes (Rebollar-Alviter et al. 2020). Además, se ha reportado a *N. rosae* como agente causal de la pudrición de fruto en uva presentando insensibilidad a azoxystrobin (Cosseboom and Hu, 2021). Estudios realizados evidenciaron que *N. rosae* es insensible al grupo de las Qol, sugiriendo

que aquellos productos que contienen fungicidas de este grupo son inefectivos y no deberían usarse para el control de esta enfermedad (Baggio et al. 2019).

En el caso, de los tratamientos biológicos, solo *T. asperellum*, redujo parcialmente el desarrollo de la enfermedad de forma preventiva, no así, *T. koningiopsis* y *B. amyloliquefasciens*, sin embargo, presentaron resultados intermedios comparados con los demás tratamientos en peso fresco total de manera preventiva y longitud de raíz de manera curativa, aunado a esta variable *T. koningiopsis* tuvo los mismos efectos. Además, los resultados de estos mismos tratamientos no fueron favorables de forma curativa en la incidencia, severidad y mortalidad incluido el tratamiento a base de *Streptomyces* spp. y el fungicida iprodiona. *T. asperellum*, actúa mediante: mecanismos de acción estimulando el crecimiento radical, además, solubiliza nutrientes e induce respuestas inmunes en la planta (ISR) (Fiorentino et al. 2018; Tandon et al. 2020). De manera general *Trichoderma* spp. incluye una variedad de mecanismos de acción como inducción de la respuesta de defensa de las plantas, competencia, micoparasitismo y antibiosis (Vinale et al., 2008), que se reflejan en las variables antes mencionadas. Sin embargo, no todas las especies de *Trichoderma* presentan todos los mecanismos de acción. Estudios realizados por Texeira et al. (2015), demostraron que *T. harzianum* no presentó inhibición contra *P. longisetula* en condiciones *in vitro*. Por otro lado, Amrutha y Vijayaraghavan (2018), evaluaron *T. asperellum* contra *N. clavispora* agente causal del tizón de la hoja de fresa, bajo condiciones *in vitro*, presentaron una eficacia de inhibición del 66.67 %. Widyaningsih y Triasih (2021), evaluaron a *T. harzianum* contra *Pestalotiopsis* sp. agente causal de la pudrición de corona de la fresa en condiciones *in vitro* obteniendo 32 % de inhibición, también se observó que las variedades Early Bright y Tokii presentaron resistencia a la enfermedad. Los resultados en esta investigación realizada pueden ser una opción de control o estimulación del crecimiento radicular incluidos en un programa de manejo integrado que puede ser combinado o alternado con hymexazol (Fan et al. 2018; Zhang et al. 2021). Por el contrario, el tratamiento a base de *Streptomyces* sp. resultó con un efecto de medio a bajo. *Streptomyces* sp. es una actinobacteria que actúa mediante antibiosis, pero

también como inductor de resistencia (Suárez-Moreno et al. 2019; Chaiharn et al. 2020).

En el caso de los productos a base de microorganismos es poco probable que muestren un efecto de manera curativa ya que se le dio ventaja a *N. rosae* de causar infección. En estudios realizados para determinar el tiempo de germinación de los conidios de *P. longisetula* se observó que germinaron a las 48 h después de la inoculación sobre hojas de fresa y 72 h después de la inoculación formaron los tubos germinativos, logrando penetrar en el interior de las células a las 96 h (Rodríguez et al. 2014). En esta investigación los primeros síntomas iniciaron alrededor de 7 días después de la inoculación, obteniendo una diferencia con el reporte anterior de 4 a 5 días, sin embargo, la inoculación se realizó en órganos diferentes. En el caso de iprodiona, es un fungicida que se ha utilizado desde 1970 y ha presentado cierta resistencia a hongos como *Botrytis* sp. (Grabke et al. 2014), además es un fungicida translaminar lo que pudo ser una limitante para el control de *N. rosae* de forma curativa. Obregón et al. (2018), mencionan que iprodiona inhibió el crecimiento micelial de *N. clavispora* aproximadamente en un 25 % de forma *in vitro*. Aunque, Rebollar- Alviter et al. (2020), lo evaluaron *in vitro* contra *N. rosae* presentando 100 % de inhibición, sugiriendo una respuesta diferencial del fungicida a las diferentes especies de *Neopestalotiopsis*.

De manera general los resultados de este estudio y los mecanismos de acción presentados sugieren que, aunque *T. asperellum* y *Streptomyces* sp. resultaron con menos eficacia, en relación con los tratamientos químicos de forma preventiva y curativa, podrían ser usados en un programa de manejo de la enfermedad, posterior a los tratamientos pre-transplante.

En resumen, este estudio evidencia que los tratamientos pre-transplante a base de pydiflumetofeno + fludioxonil, procloraz, cyprodinil + fludioxonil e hymexazol tienen un alto potencial de usarse como herramientas para el diseño de programas de manejo integrado de la pudrición de corona por *N. rosae*, ya que además fueron los tratamientos junto con *T. asperellum* y *Streptomyces* spp. que permitieron llegar a floración y maduración de fruto. Después de haber finalizado la evaluación del

experimento, los tratamientos propuestos en la presente investigación se pueden rotar o alternar con thiram, captan, difenoconzol + azoxystrobin o *T. asperellum* que fueron los que mantuvieron vivas algunas de las plantas junto con hymexazol en post-infección, sin embargo, hubo de baja a nula floración. La eficacia de los tratamientos se ve fuertemente comprometida cuando los fungicidas químicos o biológicos se aplican en post-transplante post-infección, o en plantas infectadas que provienen de viveros con poco control de calidad fitosanitaria. Esta es la realidad que enfrentan los productores de fresa en la región, la misma que ocurrió en este experimento ante la imposibilidad de utilizar plantas de viveros comerciales, libres de la enfermedad. Aun con esta condición que enfrentan los productores de fresa, este estudio ofrece alternativas para prevenir, reducir o posponer el desarrollo de la enfermedad, permitiendo a los productores llegar a la etapa de cosecha. Considerando la importancia de la pudrición de raíz, corona y manchas foliares ocasionadas por *N. rosae* y la poca información sobre la eficacia de fungicidas de diferente modo de acción, así como materiales biológicos a nivel mundial, los resultados de esta investigación brindan información útil para el diseño de estrategias de manejo integrado de *N. rosae*, hongo fitopatógeno emergente que ha ocasionado grandes pérdidas económicas en los últimos 5 años a los productores de fresa en el mundo.

3.5. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indicaron que existen fungicidas con potencial para el control de *N. rosae* reduciendo significativamente la incidencia, severidad y mortalidad, así como una mayor biomasa total. En el experimento pre-infección los resultados indicaron que pydiflumetofeno + fludioxonil redujo la incidencia y severidad de la enfermedad, así como, la mortalidad de manera similar a procloraz, procloraz + thiram y cyprodinil + fludioxonil con una eficacia en la mortalidad final del 99.82 %. El pydiflumetofeno + fludioxonil resultó en mayor peso fresco foliar y peso seco foliar, así como mayor peso seco total. El hymexazol promovió mayor peso fresco y seco del área radical, así como mayor peso fresco total. El tratamiento a base de procloraz, además de ser efectivo en la protección contra la enfermedad, favoreció una mayor longitud de raíz, superior a los demás tratamientos.

En el segundo experimento post-infección, procloraz + thiram y captan presentaron menor incidencia de la enfermedad, sin embargo, thiram e hymexazol mostraron menor severidad y procloraz + thiram junto con la aplicación a base solo de thiram mostraron una eficacia en la mortalidad final de 34.32 y 37.31 % respectivamente. El hymexazol, también favoreció una mayor biomasa total. con los tratamientos biológicos a base de *T. asperellum* y *T. koningiopsis*, se observó mayor severidad y mortalidad final. Aunque los resultados de las aplicaciones post-infección pueden considerarse positivos, comparadas con las aplicaciones en forma preventiva al momento del transplante, el porcentaje de control de la pudrición de la corona y raíz ocasionado por *N. rosae* es bajo.

Los resultados de este estudio pueden usarse como un enfoque de manejo integral en aplicaciones preventivas principalmente con la finalidad de reducir el inóculo primario proporcionando una protección a las plantas una vez establecidas en campo.

3.6. LITERATURA CITADA

- Acosta-González, U., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Hernández-Castrejón, J., Romero-Bautista, A., and Rebollar-Alviter, A. 2021. Comparative performance of fungicides and biocontrol products in the management of *Fusarium* wilt of blackberry. *Plant Dis.* 106: 1419-1427.
- Alothman, Z. A., Bahkali, A. H., Elgorban, A. M., Al-Otaibi, M. S., Ghfar, A. A., Gabr, S. A., Wabaidur, S. M., Habila, M. A., and Ahmed, A. Y. B. H. 2020. Bioremediation of explosive TNT by *Trichoderma viride*. *Molecules* 25: 1393.
- Amini, J., and Sidovich, D. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with Fusarium wilt of tomato. *J. Plant Prot. Res.* 50:172-178.
- Amiri, A., Heath, S. M., and Peres, N. A. 2014. Resistance to fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from strawberry. *Plant Dis.* 98: 532-539.
- Amrutha, P., and Vijayaraghavan, R. 2018. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf blight of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 622-628.
- Ayoubi, N., and Soleimani, M. J. 2016. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis asiatica* causing leaf spot on sweet almond. *J. Plant. Pathol.* 98: 321-325.
- Baggio, J., Forcelini, B. B., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., and Peres, N. 2019. Characterization, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Pestalotiopsis* spp. on strawberry in the US. *Phytopathology* 109: S2.17.
- Baggio, J. S., and Peres, N. A. 2020. *Pestalotia* Leaf Spot and Fruit Rot of Strawberry: PP357, 9/2020. EDIS, 2020(5).
- Baggio, J. S., Forcelini, B. B., Wang, N. Y., Ruschel, R. G., Mertely, J. C., and Peres, N. A. 2021. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Dis.* 105: 305-315.
- Bin, G., Xingping, L., Chao, X., and Hongyan, Z. 2013. Chemical control against *Pestalotiopsis microspora* in the leaves of *Photinia fraseri*. *J. Northwest Forestry University.* 28:131-135.
- Bononi, L., Chiaramonte, J. B., Pansa, C. C., Moitinho, M. A., and Melo, I. S. 2020. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. *Sci. Rep.* 10: 1-13.

- Carré-Missio, V., Rodrigues, F. Á., Schurt, D. A., Rezende, D. C., Ribeiro, N. B., and Zambolim, L. 2010. Foliar application of potassium silicate, acibenzolar-S-methyl and fungicides on the reduction of *Pestalotia* leaf spot on strawberry. *Tropical Plant Pathol* 35: 182-185.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., and Ongena, M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyoliquefaciens*. *Microb. Biotechnol.* 8: 281-295.
- Chamorro, M., Aguado, A., and De los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Dis.* 100: 1495.
- Chaiharn, M., Theantana, T., and Pathom-Aree, W. 2020. Evaluation of biocontrol activities of *Streptomyces* spp. against rice blast disease fungi. *Pathogens* 9: 126.
- Chen, K., Tian, Z., Luo, Y., Cheng, Y., and Long, C. A. 2018. Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyoliquefaciens* DH-4 against citrus green mold. *Phytopathology* 108: 1253-1262.
- Cosseboom, S. D., and Hu, M. 2021. Diversity, pathogenicity, and fungicide sensitivity of fungal species associated with late-season rots of wine grape in the Mid-Atlantic United States. *Plant Dis.* 105: 3101-3110.
- Daccò, C., Nicola, L., Temporiti, M. E. E., Mannucci, B., Corana, F., Carpani, G., and Tosi, S. 2020. *Trichoderma*: evaluation of its degrading abilities for the bioremediation of hydrocarbon complex mixtures. *Appl. Sci.* 10: 3152.
- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., Wang, S., and Yang, C. 2019. Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyoliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microb. Cell. Fact.* 18: 1-14.
- Essa, T. A., Kamel, S. M., Ismail, A., and El-Ganainy, S. 2018. Characterization and chemical control of *Neopestalotiopsis rosae* the causal agent of strawberry root and crown rot in Egypt. *Egypt. J. Phytopathol.* 46: 1-19.
- Fan, Y., Gao, R. H., Xiao, X., and Tao, Z. 2018. Inclusion complexes of hymexazol with three different cucurbit [n] uril: preparation, and physicochemical and antifungal characterization. *Isra. J. Chemist.* 58: 466-471.
- Fernández-Ortuño, D., Pérez-García, A., Chamorro, M., de la Peña, E., de Vicente, A., and Torés, J. A. 2017. Resistance to the SDHI fungicides boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, and penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from commercial strawberry fields in Spain. *Plant Dis.* 101: 1306-1313.

- Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S. L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, N., Colla, G., and Rouphael, Y. 2018. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Front. Plant Sci.* 9: 743.
- Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., Zhang, J. B., and Liao, Y. C. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PloS one*, 10: e0116871.
- Grabke, A., Fernández-Ortuño, D., Amiri, A., Li, X., Peres, N. A., Smith, P., and Schnabel, G. 2014. Characterization of iprodione resistance in *Botrytis cinerea* from strawberry and blackberry. *Phytopathology* 104: 396-402.
- Hashem, A., Tabassum, B., and Abd_Allah, E. F. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saud. J. Biolo. Sci.* 26: 1291-1297.
- He, L., Cui, K., Song, Y., Li, T., Liu, N., Mu, W., and Liu, F. 2020. Activity of the novel succinate dehydrogenase inhibitor fungicide pydiflumetofeno against SDHI-sensitive and SDHI-resistant isolates of *Botrytis cinerea* and efficacy against gray mold. *Plant Dis.* 104: 2168-2173.
- Hernández-Cruz, A., Saldivia-Tejeda, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Nava-Díaz, C., Martínez-Bolaños, L., and Rebollar-Alviter, A. 2020. Evaluation of full-season programs for the management of Fusarium wilt of blackberry caused by a new lineage of the *Fusarium oxysporum* species complex. *Crop Prot.* 134: 105167.
- Hidrobo, J., Ramirez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Herrera, K., and Leon-Reyes, A. 2021. First report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on strawberry in Ecuador. *Plant Dis.* 106:1066.
- Intriago-Reyna, H. O., Rivas-Figueroa, F. J., Rivera-Casignia, Á. M., and Álvarez-Romero, P. I. 2021. Outbreaks of crown rot in *Fragaria x ananassa* caused by *Neopestalotiopsis mesopotamica* in Ecuador. *Emir. J. Food. Agricult.* 520-527.
- Lin, L. Z., Zheng, Q. W., Wei, T., Zhang, Z. Q., Zhao, C. F., Zhong, H., Xu, Q. Y., Lin, J. F., and Guo, L. Q. 2020. Isolation and characterization of fengycins produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and its broad-spectrum antimicrobial potential against multidrug-resistant foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 11:579621.
- Madden, L. V., Hughes, G., and van den Bosch, F. 2007. The Study of Plant Disease 21 Epidemics. APS Press, St. Paul, MN.

- McQuilken, M. P., and Hopkins, K. E. 2004. Biology and integrated control of *Pestalotiopsis* on container-grown ericaceous crops. *Pest Manag. Sci: Form Pest Sci.*, 60: 135-142.
- Moosavi, B., Berry, E. A., Zhu, X. L., Yang, W. C., and Yang, G. F. 2019. The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics. *Cell. Mol. Lif. Sci.* 76: 4023-4042.
- Myresiotis, C. K., Karaoglanidis, G. S., Vryzas, Z., and Papadopoulou-Mourkidou, E. 2012. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. *Pest Manag. Sci.* 68: 404-411.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N., and Viljoen, A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot.* 26: 697-705.
- Obregón, V. G., Meneguzzi, N. G., Ibañez, J. M., Lattar, T. E., and Kirschbaum, D. S. 2018. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. *Plant Dis.* 102: 1856-1856.
- Oiki, S., Yaguchi, T., Urayama, S. I., and Hagiwara, D. 2022. Wide distribution of resistance to the fungicides fludioxonil and iprodione in *Penicillium* species. *Plos one.* 17: e0262521.
- Popko Jr, J. T., Sang, H., Lee, J., Yamada, T., Hoshino, Y., and Jung, G. 2018. Resistance of *Sclerotinia homoeocarpa* field isolates to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Plant Dis.* 102: 2625-2631.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M., and Parra-Robles, B. E. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *Plant Dis.* 104: 2054-2059.
- Rodrigues, F. A., Silva, I. T., Antunes Cruz, M. F., and Carré-Missio, V. 2014. The infection process of *Pestalotiopsis Longisetula* leaf spot on strawberry leaves. *J. Phytopathol.* 162: 690-692.
- Schabenberger, O. and Pierce, F. J. 2001. Contemporary statistical models for the plant and soil sciences. CRC press. Pag. 760. ISBN: 9781584881117.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SIAP. 2021. Cierres de producción agrícola. (<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/consultado> 3-01-22)
- Shi, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Xue, C., Ma, Y., and Wang, F. 2021. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing calyx and receptacle blight on strawberry in China. *Plant Dis.* 106: 1307.

- Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B. C., Tewari, A. K., and Kumar, J. 2018. Review on plant-*Trichoderma*-pathogen interaction. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7: 2382-2397.
- Sigillo, L., Ruocco, M., Gualtieri, L., Pane, C., and Zaccardelli, M. 2020. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. *J. Plant. Pathol.* 102: 281-281.
- Suárez-Moreno, Z. R., Vinchira-Villarraga, D. M., Vergara-Morales, D. I., Castellanos, L., Ramos, F. A., Guarnaccia, C., Degrassi, G., Venturi, V., and Moreno-Sarmiento, N. 2019. Plant-growth promotion and biocontrol properties of three *Streptomyces* spp. isolates to control bacterial rice pathogens. *Front. Microbiol.* 10: 290.
- Suginoshita Rebello, C., Baggio, J. S., Forcelini, B. B., and Peres, N. A. 2022. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* species complex from strawberry to fungicide alternatives to quinone-outside inhibitors. *Plant Dis.* doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1934-RE
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., Yan, J., Zhang, W., and Li, X. 2021. Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Prot.* 147: 105710.
- Tandon, A., Fatima, T., Shukla, D., Tripathi, P., Srivastava, S., and Singh, P. C. 2020. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *J. Kin. Sau. Uni-Sci.* 32: 791-798.
- Teixeira, M. A., Martins, R. M. S., Vieira, R. F., Vildoso, C. I. A., Adami, A. A. V., and Ferreira, A. C. 2015. *In vitro* identification and control of *Pestalotiopsis longisetula* fungus, pathogens strawberry crop. *Rev. Agrogeoam.* 7: 59-65.
- Tejada, M., Gómez, I., García-Martínez, A. M., Osta, P., and Parrado, J. 2011. Effects of prochloraz fungicide on soil enzymatic activities and bacterial communities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 1708-1714.
- Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., and Tripathi, R. D. 2013. *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Cle. Technol. Environ. Poli.* 15: 541-550.
- Veloukas, T., Markoglou, A. N., and Karaoglanidis, G. S. 2013. Differential effect of Sdh B gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* 97: 118-122.
- Vinale, F., Sivasitthamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40:1-10.

- Wen, H., Wei, J., Zhang, G., Bi, Y., and Yan, Z. 2019. Laboratory toxicity of nine fungicides against *Neopestalotiopsis clavispora*. Chin. J. Pest. Sci. 21: 437-443.
- Widyaningsih, S., and Triasih, U. 2021. Biological control of strawberry crown rot disease (*Pestalotiopsis* sp.) using *Trichoderma harzianum* and endophytic bacteria. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Sci. 752: 012052
- Yang, M. M., Mavrodi, D. V., Mavrodi, O. V., Bonsall, R. F., Parejko, J. A., Paulitz, T. C., Tomashow, L. S., Yang, H. T., Weller, D. M., and Guo, J. H. 2011. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields. Phytopathology 10: 1481–1491.
- Yang, J. H., Brannen, P. M., and Schnabel, G. 2015. Resistance in *Alternaria alternata* to SDHI fungicides causes rare disease outbreak in peach orchards. Plant Dis. 99: 65-70.
- Zhang, C., Wang, W., Xue, M., Liu, Z., Zhang, Q., Hou, J., Xing, M., Wang, R., and Liu, T. 2021. The combination of a biocontrol agent *Trichoderma asperellum* SC012 and hymexazol reduces the effective fungicide dose to control fusarium wilt in cowpea. J. Fungi 7: 685.