



## **Uso de hongos benéficos para el control de *Neopestalotiopsis* sp. en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)**

Tesis profesional para obtener el título de:  
**Ingeniero en Innovación Agrícola  
Sustentable**

Presentan:

**García Macías Juan Antonio  
Quiroz García Juan Carlos**

Asesor de Tesis:

**M.C. Anabel Flores Lee**

Coasesor de Tesis:

**Dra. Virginia Ortiz Timoteo**



## **Autorización de presentación de trabajo de titulación**

Se autoriza al estudiante Juan Antonio García Macías y Juan Carlos Quiroz García inscrito en la Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable del Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, con número de control AS20110625/ AS20110082, a defender su proyecto de trabajo de titulación Uso de hongos benéficos para el control de *Neopestalotiopsis* sp. en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) ante el comité sinodal asignado.

La presente se expide en Abasolo Guanajuato al 25 de noviembre de 2024.

---

Anabel Flores Lee  
(Presidente del sínodo)

---

Virginia Ortiz Timoteo  
(Secretario del sínodo)

---

Mariana Quiroz González  
(Vocal del sínodo)

## **Dedicatoria**

### **Juan Antonio Garcia Macias**

Quiero dar gracias a Dios por permitirme terminar este proyecto por brindarme los conocimientos, salud, paz y una familia. A mis padres, a mis hermanas, a mi novia que me han apoyado en el transcurso de mi carrera para lograr cumplir mis sueños, gracias a sus palabras motivándome día con día, para cumplir con mis objetivos y con lo que me proponga. Este trabajo de Investigación se los dedico a ellos por el esfuerzo de darme estudio por su apoyo para salir adelante y crecer como persona y como estudiante.

### **Juan Carlos Quiroz García**

A mis padres quienes son mi mayor motivación para seguir cumpliendo mis metas, me impulsan a ser mejor cada día y me han apoyado en todo a lo largo de mi vida. A mi hermana por estar ahí apoyándome siempre. A toda mi familia quienes son otra de mis motivaciones para lograr alcanzar mis sueños. A dios por haberme dado a mí y a toda mi familia salud y bienestar para poder seguir con mis estudios.

## **Agradecimientos**

### **Juan Antonio Garcia Macias**

A mi familia y mi novia por el apoyo incondicional, por motivarme a salir adelante y ayudarme a cumplir mis metas.

### **Juan Carlos Quiroz García**

A mi familia por su apoyo en todo momento, por ser mi principal motivación para poder culminar mis objetivos.

### **Ambos**

A la M.C. Anabel Flores Lee, nuestra directora de tesis, por la orientación que nos brindó, por sus conocimientos, por su tiempo y por ser una gran maestra.

A nuestros compañeros y amigos que nos apoyaron en lo académico como en lo personal. Entre ellos a Jovana, Hernán, Alejandra, Eliseo, Iván, Pao que fueron compañeros que estuvieron apoyándonos en todo momento.

Al ITESA (Instituto Tecnológico Superior de Abasolo) por ser parte fundamental de este logro obtenido por prestarnos sus instalaciones y el equipo necesario para culminar con el proyecto.

## Resumen

La presente investigación que lleva por título “Uso de hongos benéficos para el control de *Neopestalotiopsis* sp. en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)” se realizó con el objetivo de evaluar diferentes hongos benéficos para el control biológico de *Neopestalotiopsis* sp. en el cultivo de fresa. El patógeno se obtuvo de plantas enfermas con la sintomatología característica de las mismas. A los 2 meses de trasplante, se realizaron aplicaciones de los tratamientos a base de controladores biológicos preventivos, posterior a esto se inoculó la enfermedad en las plantas excepto en el testigo sano. El proyecto constó de 5 tratamientos los cuales fueron testigo sano (T1), testigo enfermo (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5). Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente aleatorio (DBCA), el cual se integró en 3 bloques. Las variables a evaluar fueron la patogenicidad y virulencia de *Neopestalotiopsis* sp. en plantas de fresa, mortalidad de ejemplares de fresa una vez inoculadas con la enfermedad y la efectividad de los tratamientos control frente a la enfermedad. Los tratamientos a base de hongos benéficos presentaron menor grado de severidad a comparación del testigo enfermo. El tratamiento de *T. harzianum* mostró menor número de ejemplares muertos a causa de la enfermedad. Se concluye que los tratamientos evaluados son una alternativa para combatir la enfermedad en cultivos de fresa de manera preventiva.

**Palabras Clave:** sustentabilidad, identificación, efectividad, microorganismos, enfermedad, patogenicidad.

## Abstract

The present investigation entitled "Use of beneficial fungi for the control of *Neopestalotiopsis* sp. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch)" was carried out with the objective of evaluating different beneficial fungi for the biological control of *Neopestalotiopsis* sp. in strawberry. The pathogen was obtained from diseased plants with their characteristic symptomatology. Two months after transplanting, applications of treatments based on preventive biological controllers were carried out, after which the disease was inoculated on all plants except the healthy control. The project consisted of 5 treatments which were healthy control (T1), diseased control (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) and *Beauveria bassiana* (T5). A completely randomized block experimental design (CRBD) was used, which was integrated in 3 blocks. The variables to be evaluated were the pathogenicity and virulence of *Neopestalotiopsis* sp. on strawberry plants, mortality of strawberry specimens once inoculated with the disease, and the effectiveness of control treatments against the disease. Treatments based on beneficial fungi showed a lower degree of severity compared to the diseased control. The treatment of *T. harzianum* showed a lower number of specimens dead due to the disease. It is concluded that the treatments evaluated are an alternative to preventively combat the disease in strawberry crops.

**Key Words:** sustainability, identification, effectiveness, microorganisms, disease, pathogenicity.

# Índice

|                                            |          |
|--------------------------------------------|----------|
| Dedicatoria .....                          | iii      |
| Agradecimientos.....                       | iv       |
| Resumen .....                              | v        |
| Abstract .....                             | vi       |
| Símbolos y/o abreviaturas .....            | xvii     |
| Glosario .....                             | xviii    |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                  | <b>1</b> |
| <b>I. GENERALIDADES DEL PROYECTO .....</b> | <b>2</b> |
| 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....       | 3        |
| 1.2 JUSTIFICACIÓN .....                    | 3        |
| 1.3 HIPÓTESIS .....                        | 3        |
| 1.4 OBJETIVOS .....                        | 3        |
| 1.4.1 Objetivo General.....                | 3        |
| 1.4.2 Objetivos Específicos .....          | 3        |
| <b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>             | <b>5</b> |
| 2.1 Cultivo de fresa .....                 | 6        |
| 2.2. Origen.....                           | 6        |
| 2.3. Importancia del cultivo.....          | 6        |
| 2.4. Taxonomía .....                       | 7        |
| 2.5. Requerimientos edafoclimáticos.....   | 8        |
| 2.5.1 Suelo .....                          | 8        |
| 2.5.2 Temperatura.....                     | 9        |
| 2.5.3 Humedad relativa .....               | 9        |
| 2.5.4 Altura.....                          | 9        |

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.5 Fotoperiodo .....                                                         | 10 |
| 2.6 Descripción botánica .....                                                  | 10 |
| 2.7. Enfermedades del cultivo de fresa presentes en la corona del cultivo ..... | 12 |
| 2.7.1. Marchitamiento por <i>Fusarium</i> .....                                 | 12 |
| 2.7.2. Marchitamiento por <i>Verticillium</i> .....                             | 13 |
| 2.7.3. Marchitamiento por <i>Rhizoctonia</i> .....                              | 15 |
| 2.7.4. Marchitamiento por <i>Phytophthora</i> .....                             | 16 |
| 2.7.5. Pudrición de corona por <i>Neopestalotiopsis</i> spp. ....               | 17 |
| 2.7.5.1. Clasificación taxonómica de <i>Neopestalotiopsis</i> .....             | 19 |
| 2.7.5.2. Sintomatología .....                                                   | 19 |
| 2.8. Métodos de control de enfermedades .....                                   | 20 |
| 2.8.1. Control físico .....                                                     | 20 |
| 2.8.2. Control cultural .....                                                   | 20 |
| 2.8.2. Control químico .....                                                    | 21 |
| 2.8.3. Control biológico .....                                                  | 21 |
| 2.9. <i>Trichoderma harzianum</i> como agente de control biológico .....        | 22 |
| 2.9.1. Clasificación taxonómica .....                                           | 22 |
| 2.9.2. Descripción general .....                                                | 22 |
| 2.9.3. Ciclo biológico .....                                                    | 23 |
| 2.9.4. Mecanismos de acción .....                                               | 23 |
| 2.9.4.1. Competencia .....                                                      | 23 |
| 2.9.1.2. Micoparasitismo .....                                                  | 24 |
| 2.9.1.3. Antibiosis .....                                                       | 24 |
| 2.9.1.4. Inducción de resistencia .....                                         | 25 |
| 2.10 <i>Beauveria bassiana</i> como agente de control biológico .....           | 25 |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.10.1. Clasificación taxonómica .....                                            | 25        |
| 2.10.2. Descripción general.....                                                  | 26        |
| 2.10.3. Ciclo biológico .....                                                     | 26        |
| 2.10.4. Mecanismos de acción .....                                                | 26        |
| 2.11 <i>Metarhizium anisopliae</i> como agente de control biológico .....         | 27        |
| 2.11.1. Clasificación taxonómica .....                                            | 27        |
| 2.11.2. Descripción general.....                                                  | 28        |
| 2.11.3. Ciclo biológico .....                                                     | 28        |
| 2.11.4. Mecanismos de acción .....                                                | 28        |
| 2.12 Interacción de hongos benéficos frente a <i>Neopestalotiopsis</i> .....      | 29        |
| 2.12.1 Interacción <i>Beauveria bassiana</i> - <i>Neopestalotiopsis</i> .....     | 29        |
| 2.12.2 Interacción <i>Metarhizium anisopliae</i> - <i>Neopestalotiopsis</i> ..... | 29        |
| 2.12.3 Interacción <i>Trichoderma harzianum</i> - <i>Neopestalotiopsis</i> .....  | 29        |
| <b>III. METODOLOGÍA .....</b>                                                     | <b>31</b> |
| 3.1 Establecimiento del proyecto.....                                             | 32        |
| 3.1.1 Localización.....                                                           | 32        |
| 3.1.2 Tipo de suelo y clima.....                                                  | 32        |
| 3.2 Aislamiento del patógeno .....                                                | 33        |
| 3.2.1 Purificación .....                                                          | 34        |
| 3.2.2 Identificación .....                                                        | 34        |
| 3.2.3 Mantenimiento de la cepa .....                                              | 35        |
| 3.3 Diseño experimental y tratamientos .....                                      | 35        |
| 3.4 Especie a evaluada .....                                                      | 37        |
| 3.5 Establecimiento del área de trabajo .....                                     | 38        |
| 3.6 Desinfección del suelo y materiales de trabajo .....                          | 38        |

|                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7 Preparación de material vegetal .....                                                     | 39        |
| 3.8 Manejo de cultivo.....                                                                    | 39        |
| 3.8.1 Riego .....                                                                             | 39        |
| 3.8.2 Fertilización .....                                                                     | 40        |
| 3.8.3 Control de plagas .....                                                                 | 40        |
| 3.9 Inoculación de los tratamientos en el material vegetal .....                              | 42        |
| 3.9.1 Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> .....                                       | 42        |
| 3.9.2 Inoculación de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....                                      | 43        |
| 3.9.3 Inoculación de <i>Beauveria bassiana</i> .....                                          | 44        |
| 3.10 Inoculación del patógeno en la planta .....                                              | 45        |
| 3.11 Análisis estadístico .....                                                               | 46        |
| 3.12 Variables de respuesta.....                                                              | 46        |
| 3.12.1 Patogenicidad y virulencia.....                                                        | 47        |
| 3.12.2 Mortalidad de las plantas.....                                                         | 50        |
| 3.12.3 Eficiencia de los productos.....                                                       | 50        |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                                                       | <b>51</b> |
| 4.1 Identificación de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....                                       | 52        |
| 4.2 Severidad de la enfermedad en las plantas .....                                           | 54        |
| 4.2.1 Severidad 15 días después de la inoculación de la enfermedad.....                       | 54        |
| 4.2.2 Severidad de plantas 30 días de la inoculación de la enfermedad.....                    | 55        |
| 4.2.3 Severidad de plantas a los 45 días después de la inoculación de la enfermedad.<br>..... | 57        |
| 4.2.4 Severidad de plantas a los 60 días después de la inoculación de la enfermedad.<br>..... | 58        |
| 4.2.5 Severidad 75 días después de la inoculación de la enfermedad.....                       | 60        |
| 4.3 Pruebas con los postulados de Koch .....                                                  | 62        |

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| 4.4 Mortalidad de plantas .....            | 63        |
| <b>V. CONCLUSIÓN .....</b>                 | <b>66</b> |
| <b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>68</b> |
| <b>VII. ANEXOS .....</b>                   | <b>84</b> |

## Índice de tablas

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 2.1-</b> Clasificación taxonómica de la fresa. ....                                                  | 8  |
| <b>Tabla 2.2-</b> Clasificación taxonómica de la <i>Neopestalotiopsis</i> . ....                              | 19 |
| <b>Tabla 2.3-</b> Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma harzianum</i> . ....                             | 22 |
| <b>Tabla 2.4-</b> Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> . ....                                | 25 |
| <b>Tabla 2.5-</b> Clasificación taxonómica de <i>Metarhizium anisopliae</i> . ....                            | 27 |
| <b>Tabla 3.1-</b> Tratamientos en el experimento <i>in vivo</i> . ....                                        | 36 |
| <b>Tabla 3.2-</b> Distribución de los tratamientos en campo. ....                                             | 36 |
| <b>Tabla 3.3-</b> Cálculos para aplicación de Neem. ....                                                      | 41 |
| <b>Tabla 3.4-</b> Cálculos para aplicación de Piretrinas naturales. ....                                      | 42 |
| <b>Tabla 3.5-</b> Cálculos para la aplicación de producto elaborado a base de <i>T. harzianum</i> .<br>.....  | 43 |
| <b>Tabla 3.6-</b> Cálculos para la aplicación de producto elaborado a base de <i>M. anisopliae</i> .<br>..... | 44 |
| <b>Tabla 3.7-</b> Cálculos para la aplicación de producto elaborado a base de <i>B. bassiana</i> .<br>.....   | 45 |
| <b>Tabla 3.8 –</b> Virulencia de <i>Neopestalotiopsis</i> en el cultivo de fresa. ....                        | 48 |
| <b>Tabla 7.1-</b> Tabla ANOVA de los resultados, 15 días después de la inoculación. ....                      | 85 |
| <b>Tabla 7.2-</b> Tabla ANOVA de los resultados, 30 días después de la inoculación. ....                      | 86 |
| <b>Tabla 7.3-</b> Tabla ANOVA de los resultados, 45 días después de la inoculación. ....                      | 86 |
| <b>Tabla 7.4-</b> Tabla ANOVA de los resultados, 60 días después de la inoculación. ....                      | 86 |
| <b>Tabla 7.5-</b> Tabla ANOVA de los resultados, 75 días después de la inoculación. ....                      | 87 |
| <b>Tabla 7.6-</b> Tabla ANOVA de los resultados, de la mortalidad de las plantas. ....                        | 87 |
| <b>Tabla 7.7-</b> Materiales requeridos para el desarrollo del proyecto. ....                                 | 88 |
| <b>Tabla 7.8-</b> Datos obtenidos en el bloque 1. ....                                                        | 89 |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 7.9-</b> Datos obtenidos en el bloque 2.....  | 91 |
| <b>Tabla 7.10-</b> Datos obtenidos en el bloque 3..... | 93 |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.1-</b> Cosecha de fresa. ....                                                                                                                                                                                                  | 7  |
| <b>Figura 2.2-</b> Morfología y partes de la planta de fresa (Bonilla et al., 2011).....                                                                                                                                                   | 11 |
| <b>Figura 2.3-</b> Daños en el cultivo de fresa por <i>Fusarium</i> (Koike y Bolda, 2013). ....                                                                                                                                            | 12 |
| <b>Figura 2.4-</b> Tejido de la corona infectado por <i>Fusarium</i> (Koike y Bolda, 2013). ....                                                                                                                                           | 13 |
| <b>Figura 2.5-</b> Síntomas presentes en el área del follaje vegetal a causa de <i>Verticillium</i> (Bolda, 2011). ....                                                                                                                    | 14 |
| <b>Figura 2.6-</b> Síntoma en el tejido interno causado por <i>Verticillium</i> (Bolda, 2011). ....                                                                                                                                        | 14 |
| <b>Figura 2.7-</b> Tejido interno de la corona infectado por <i>Rhizoctonia</i> (Obregón et al, 2020).<br>.....                                                                                                                            | 16 |
| <b>Figura 2.8-</b> Síntomas presentes en el cultivo de fresa con <i>Phytophthora</i> (Obregón et al., 2020). ....                                                                                                                          | 17 |
| <b>Figura 2.9-</b> Síntoma presente en el tejido interno del cultivo causado por <i>Neopestalotiopsis</i> (Obregón et al., 2020). ....                                                                                                     | 18 |
| <b>Figura 2.10-</b> Síntomas presentes en el área del follaje (Obregón et al., 2020).....                                                                                                                                                  | 19 |
| <b>Figura 3.1-</b> Localización del proyecto en la etapa <i>in vivo</i> (Google Earth, 2023). ....                                                                                                                                         | 32 |
| <b>Figura 3.2-</b> A) Preparación de medio de cultivo PDA en el área de laboratorio, B) Selección de material vegetal infectado para el proceso de aislamiento y C) Crecimiento fúngico de interés para el proyecto de investigación. .... | 33 |
| <b>Figura 3.3-</b> Crecimiento de cepa patógena.....                                                                                                                                                                                       | 34 |
| <b>Figura 3.4-</b> Conidios de <i>Neopestalotiopsis</i> observados al microscopio. ....                                                                                                                                                    | 35 |
| <b>Figura 3.5-</b> Distribución de los tratamientos en campo.....                                                                                                                                                                          | 37 |
| <b>Figura 3.6-</b> Planta de fresa variedad San Andreas (A y B). ....                                                                                                                                                                      | 37 |
| <b>Figura 3.7-</b> Establecimiento del área de trabajo (A y B). ....                                                                                                                                                                       | 38 |
| <b>Figura 3.8-</b> Aplicación del producto al suelo para el proceso de biosolarización. ....                                                                                                                                               | 38 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 3.9-</b> Desinfección del área de trabajo (A). Desinfección de materiales utilizados en el experimento (B). .....                                                                                                                                                                                         | 39 |
| <b>Figura 3.10-</b> Aplicación de riego en las plantas de fresa. ....                                                                                                                                                                                                                                               | 40 |
| <b>Figura 3.11-</b> Araña roja presente en el cultivo ( <i>Tetranychus urticae</i> ). ....                                                                                                                                                                                                                          | 41 |
| <b>Figura 3.12-</b> Aplicación para el control de araña roja. ....                                                                                                                                                                                                                                                  | 42 |
| <b>Figura 3.13-</b> Inoculación de <i>T. harzianum</i> en las plantas de fresa. ....                                                                                                                                                                                                                                | 43 |
| <b>Figura 3.14-</b> Inoculación de <i>M. anisopliae</i> en las plantas de fresa. ....                                                                                                                                                                                                                               | 44 |
| <b>Figura 3.15-</b> Inoculación de <i>B. bassiana</i> en las plantas de fresa.....                                                                                                                                                                                                                                  | 44 |
| <b>Figura 3.16-</b> A) Corte en la corona de la planta, B) Cinta para injertos utilizada para cubrir el corte en la corona de la planta, C) Corte en el PDA con la presencia del micelio del fitopatógeno y D) Colocación de la cinta en el área donde se realizó el corte.....                                     | 46 |
| <b>Figura 3.17-</b> Aislados de la enfermedad de los postulados de Koch. ....                                                                                                                                                                                                                                       | 47 |
| <b>Figura 4.1-</b> Crecimiento de <i>Neopestalotiopsis</i> sp. en caja Petri con medio de cultivo PDA: (A) <i>Neopestalotiopsis</i> sp aislado de planta de fresa con sintomatología característica de la enfermedad y (B) <i>Neopestalotiopsis</i> sp. aislado en caja de Petri por Jayawardena et al. (2016)..... | 52 |
| <b>Figura 4.2-</b> Identificación de <i>Neopestalotiopsis</i> en microscopio: (A) Conidios libres en preparación de frotis, (B) Conidios inmaduros. De acuerdo con Morales-Mora et al. (2019) presentan: (C) Conidios libres y Jayawardena et al. (2016) muestran: (D) Conidios inmaduros.....                      | 53 |
| <b>Figura 4.3-</b> Síntomas presentados a los 15 días: A) Planta sana, B) Ligero amarillamiento y C) Manchas necróticas concéntricas en las hojas.....                                                                                                                                                              | 54 |
| <b>Figura 4.4-</b> Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 15 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), <i>Trichoderma harzianum</i> (T3), <i>Metarhizium anisopliae</i> (T4) y <i>Beauveria bassiana</i> (T5). ....                            | 55 |
| <b>Figura 4.5-</b> Síntomas presentados a los 30 días: A) Planta sana, B) Ligero amarillamiento y C) Manchas necróticas concéntricas en las hojas.....                                                                                                                                                              | 56 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 4.6-</b> Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 30 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), <i>Trichoderma harzianum</i> (T3), <i>Metarhizium anisopliae</i> (T4) y <i>Beauveria bassiana</i> (T5).  | 56 |
| <b>Figura 4.7-</b> Síntomas presentados a los 45 días: A) Lesiones en peciolo y B) Hojas viejas necrosadas.                                                                                                                                                                          | 57 |
| <b>Figura 4.8-</b> Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 45 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), <i>Trichoderma harzianum</i> (T3), <i>Metarhizium anisopliae</i> (T4) y <i>Beauveria bassiana</i> (T5).  | 58 |
| <b>Figura 4.9-</b> Síntomas presentados a los 60 días: A) Lesiones en peciolo y B) Hojas viejas necrosadas.                                                                                                                                                                          | 59 |
| <b>Figura 4.10-</b> Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 60 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), <i>Trichoderma harzianum</i> (T3), <i>Metarhizium anisopliae</i> (T4) y <i>Beauveria bassiana</i> (T5). | 60 |
| <b>Figura 4.11-</b> Síntomas presentados a los 75 días: A) Áreas de color marrón en la corona y B) Planta colapsada.                                                                                                                                                                 | 61 |
| <b>Figura 4.12-</b> Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 75 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), <i>Trichoderma harzianum</i> (T3), <i>Metarhizium anisopliae</i> (T4) y <i>Beauveria bassiana</i> (T5). | 62 |
| <b>Figura 4.13-</b> <i>Neopestalotiopsis</i> sp. aislado de material vegetal infectado.                                                                                                                                                                                              | 63 |
| <b>Figura 4.14-</b> Mortalidad de plantas por tratamiento.                                                                                                                                                                                                                           | 65 |
| <b>Figura 7.1-</b> Cronograma de actividades del presente proyecto de investigación.                                                                                                                                                                                                 | 85 |

## **Símbolos y/o abreviaturas**

|                       |                               |
|-----------------------|-------------------------------|
| <b>ha</b>             | hectárea                      |
| <b>t</b>              | tonelada                      |
| <b>cm</b>             | centímetro                    |
| <b>°C</b>             | grados Celsius                |
| <b>msnm</b>           | metros sobre el nivel del mar |
| <b>m</b>              | metro                         |
| <b>%</b>              | por ciento                    |
| <b>mm</b>             | milímetro                     |
| <b>h</b>              | hora                          |
| <b>N</b>              | norte                         |
| <b>W</b>              | oeste                         |
| <b>kg</b>             | kilogramo                     |
| <b>ml</b>             | mililitro                     |
| <b>L</b>              | litro                         |
| <b>Pza</b>            | pieza                         |
| <b>g</b>              | gramo                         |
| <b>mm<sup>2</sup></b> | milímetro cuadrado            |

## Glosario

**Acérvulo:** Cuerpo asexual que produce conidios (Agrios, 2005).

**Antagonista:** Inhibe el crecimiento y desarrollo del patógeno (Barrera y Echenique, 2019).

**Biosolarización:** Desinfección del suelo utilizando energía solar y sustancias tóxicas que se originan de la descomposición de residuos orgánicos (Perniola et al., 2020).

**Conidio:** Son esporas asexuales que se encuentran en los extremos de las hifas (Kuhar et al., 2013).

**Control biológico:** Uso de organismos vivos para el control de otros organismos que provocan daños (Marina, 2018).

**Enzima:** Proteínas formadas por aminoácidos unidos, que provocan en los organismos una gran serie de reacciones químicas (Ramírez y Ayala, 2014).

**Medio de cultivo:** Es un conjunto de sustancias como lo son los nutrientes que garantizan el desarrollo y conservación de microorganismos (Rodríguez y Zhurbenko, 2018).

**Metabolitos secundarios:** Son compuestos químicamente diversos, los cuales contribuyen a la modificación de la integridad estructural del hospedero, inhibir el proceso selectivo o a sus enzimas e interferir con su sistema regulador (Borges et al., 2010).

**Patógeno:** Un patógeno es un microorganismo que causa una enfermedad (Soriano et al., 2006).

**Patogenicidad:** Alteraciones que ocasionan los microorganismos sobre las funciones esenciales en el desarrollo de las plantas (Agrios, 2005).

**Virulencia:** Es la capacidad que tiene un microorganismo de provocar daños en el huésped (Soriano et al., 2006).

# INTRODUCCIÓN

La fresa es uno de los principales cultivos sembrados a nivel nacional teniendo una gran importancia ya que es uno de los principales cultivos en la exportación, donde se encuentran 16 estados productores de este cultivo, donde se destacan Michoacán, Baja California y Guanajuato (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2021). Es un cultivo de alto valor económico, nutricional y medicinal, sin embargo, es muy susceptible a los patógenos por lo que uno de los principales problemas durante el crecimiento del cultivo e incluso después de la cosecha, es el control de enfermedades que son sobre todo de naturaleza fúngica; muchos de estos problemas fúngicos en el cultivo de fresa son *Colletotrichum*, *Phytophthora* y *Fusarium* los cuales ocasionan un gran daño (Cano, 2013). En los últimos años, se ha presentado una enfermedad causada por un hongo patógeno que ha provocado hasta del 100% de pérdida, del género *Neopestalotiopsis* spp., el cual antes se consideraba inofensivo y en la actualidad causa podredumbre de la raíz y de la corona (Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura [INTAGRI], 2022).

El manejo y control de estos patógenos está generando un alto uso de agroquímicos para la protección del cultivo, los cuales producen un alto riesgo para la salud humana y ocasionan problemas de contaminación ambiental. Por ello, se ha optado por utilizar diferentes alternativas de control y manejo de enfermedades, una de ellas el control biológico, la cual se destaca por ser una estrategia para el control de enfermedades en las plantas, mediante el uso de hongos benéficos, entendiendo el mecanismo de control de los organismos, a través de las interacciones entre antagonistas y patógenos (Nega, 2014).

Los hongos del género *Trichoderma*, *Beauveria* y *Metarhizium* son una alternativa sana y limpia para combatir un amplio número de enfermedades, teniendo diversas aplicaciones como controladores biológicos.

Por lo anterior, el presente proyecto de investigación evaluó el control biológico mediante el uso de hongos benéficos para el control de *Neopestalotiopsis* sp. en el cultivo de fresa.

# **I. GENERALIDADES DEL PROYECTO**

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, el cultivo de fresa se ha visto afectado por diferentes problemas fitosanitarios que han causado pérdidas económicas considerables, ocasionando que los productores utilicen plaguicidas para su control provocando daños a la salud humana y contaminación en el medio ambiente. En 2021, la presencia de *Neopestalotiopsis* spp. fue un grave problema en el estado de Guanajuato, generando pérdidas totales en parcelas de fresa provocando cánceres en los tallos y una necrosis en la corona de la planta; las pérdidas de los cultivos de fresa fueron en aumento también a nivel nacional (Secretaría Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2022).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Por lo anterior, estrategias como el control biológico se consideran técnicas sustentables que permiten una reconciliación de la sociedad con el medio ambiente y una reducción considerable de los riesgos que amenazan la inocuidad de los alimentos que forman parte de la dieta de la sociedad.

## 1.3 HIPÓTESIS

Los tratamientos a base de hongos benéficos presentarán actividad antagónica contra *Neopestalotiopsis* sp. en plantas de fresa enfermas.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo General

- Evaluar el control de *Neopestalotiopsis* sp. en el cultivo de fresa mediante el uso de hongos benéficos.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

- Aislar e identificar a *Neopestalotiopsis* sp. de un ejemplar de fresa con la sintomatología característica de la enfermedad.

- Evaluar la patogenicidad y virulencia de *Neopestalotiopsis* sp. en plantas de fresa.
- Identificar el agente de control biológico que presente el mayor porcentaje de control de la enfermedad en plantas de fresa.

## **II. MARCO TEÓRICO**

## 2.1 Cultivo de fresa

La fresa es una planta herbácea que pertenece a la familia de las rosáceas y al género *Fragaria* (Bianchi, 2018). Este cultivo produce estolones, es de bajo porte, posee una raíz fibrosa con hasta 30 cm de ancho, su tallo es corto con yemas de tres tipos que pueden generar nuevas coronas (tallos) que a la vez desarrollan guías o que forman inflorescencias. Sus hojas cuentan con peciolo largos, bordes acerrados y un alto número de estomas (Olivera-Soto, 2012). La planta de fresa es perenne, forma de manera constante nuevos tallos que ocasionan que permanezca viva en forma indefinida. El fruto es un engrosamiento del receptáculo floral, los puntitos que se encuentran sobre el son los auténticos frutos (Barquero et al., 2007).

## 2.2. Origen

De acuerdo con Ávila (2015) existen una gran cantidad de especies de fresa en el mundo, sin embargo, no se sabe su origen con exactitud, ya que se indican dos zonas de origen, Europa es una de ellas en específico los Alpes europeos, y la otra es en el sur de América en Chile. El cultivo de fresa es un híbrido que pertenece a la familia de las rosáceas que surge de la cruce entre *Fragaria virginiana* Duch y *Fragaria chiloensis*, proveniente de Chile (Joublan y Vergara, 2002).

## 2.3. Importancia del cultivo

Desde un punto de vista socioeconómico, el cultivo de fresa es importante en México ya que es uno de los principales países productores. Se trasplantan alrededor de 11 935,27 hectáreas de la cuales se producen 542 890,63 toneladas, teniendo un rendimiento de 45,60 t/ha y un valor de 10 000 991 159 pesos. Además, se reconoce que esta actividad agrícola genera empleo y divisas, debido a que es un producto de exportación en sus diferentes presentaciones como lo son producto fresco, congelado o procesado. La lista de los principales estados productores la encabezan; Michoacán,

Baja California y Guanajuato, los cuales aportan más del 70% de la producción (SIAP, 2021).

El 52,21% de la producción de fresa nacional va dirigida a mercado de exportación, por esta razón este es uno de los productos más exitosos en el mercado internacional. México se encuentra entre los 3 principales exportadores de fresa con un 14,83% de las exportaciones a nivel mundial. El principal lugar de destino es Estados Unidos, el cual pide una gran demanda de producto, por lo tanto, es muy notable la importancia en la producción de este cultivo, así como el cuidado que se debe tomar en cuenta para poder cumplir con los criterios de salubridad y con los criterios de calidad para la exportación del producto (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017).



**Figura 2.1-** Cosecha de fresa.

## **2.4. Taxonomía**

De acuerdo con Figueroa et al. (2018), la clasificación taxonómica de la fresa es la presentada en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1-** Clasificación taxonómica de la fresa.

| <b>Taxón</b> | <b>Clasificación</b> |
|--------------|----------------------|
| Reino:       | Plantae              |
| División:    | Magnoliophyta        |
| Clase:       | Magnoliopsida        |
| Orden:       | Rosales              |
| Familia:     | Rosaceae             |
| Subfamilia:  | Rosoideae            |
| Tribu:       | Potentilleae         |
| Género:      | <i>Fragaria</i>      |
| Especie:     | <i>ananassa</i>      |

## **2.5. Requerimientos edafoclimáticos**

### **3.8.3 Suelo**

Los cultivos de fresa para que tengan un correcto desarrollo prefieren suelos equilibrados, con buen porcentaje de materia orgánica, que tengan buen drenado el cual es un suelo arenoso o franco arenoso, con un pH de 5.7 a 6.5 (Ávila, 2015). Esto concuerda con Bonilla et al. (2011), donde afirman que el cultivo de fresa requiere suelos arenosos o franco arenosos que cuenten con una buena cantidad de materia orgánica, aireados y bien drenados, además el rango del pH del suelo debe oscilar entre 5.7 y 6.5.

Es necesario evitar suelos compactos, ya que provocan estancamientos de agua y poca aireación, y el desarrollo de la raíz se ve limitado, por ende, incita la pudrición de las raíces (Bianchi, 2018).

### **2.5.2 Temperatura**

El cultivo de fresa se puede adaptar a varios climas, pero la temperatura óptima para un buen desarrollo está entre los 15 y 20°C este es el rango óptimo, ya que en temperaturas por debajo de los 12°C provoca deformaciones en los frutos, mientras que temperaturas altas provocan maduración en los frutos (Ávila, 2015).

La fresa se adapta bastante bien a muchos tipos de clima, sin embargo, este cultivo necesita acumular una serie de horas frío con temperaturas por debajo de 7°C, para lograr una óptima vegetación y fructificación. La parte vegetativa de la planta de fresa es altamente resistente a heladas, ya que puede llegar a soportar temperaturas de -20°C, sin embargo, los órganos florales quedan destruidos con valores algo inferiores debido a la congelación. Los valores óptimos para la fructificación oscilan entre los 15 y 20°C de temperatura media anual (Santos y Obregón, 2012).

### **2.5.3 Humedad relativa**

El cultivo de requiere valores de humedad relativa no mayores de 75%, una humedad alta es perjudicial en todo el ciclo del cultivo. Al contar con valores mayores al antes mencionado involucra una alta incidencia de enfermedades, dificultando su control y por ende haciéndolo más costoso (Gutiérrez, 2002). Por su parte, Acuña y Fischer (2020) indican que la humedad relativa promedio para el cultivo de fresa se debe mantener entre 60 y 75%, al verse alterados estos valores se debe llevar un control más severo en el manejo agronómico, enfocado al monitoreo de patógenos fúngicos.

### **2.5.4 Altura**

Bonilla et al. (2011) indican que el rango de altitud óptimo para el desarrollo del cultivo de fresa se encuentra entre 1,700 a 3,000 msnm, con este rango de altitud puede existir una incitación floral durante todo el año.

### 2.5.5 Fotoperiodo

El fotoperiodo hace referencia a la cantidad de horas luz que tiene un día, influyendo en la formación de yemas florales, crecimiento vegetativo, desarrollo de estolones, tamaño de hojas y longitud del peciolo de la planta, así como la cantidad y calidad de frutos. El fotoperiodo de día largo se basa en días con más de 12 horas de luz, mientras que en el fotoperiodo de día corto va de 8 a 11 horas de luz al día. El primer fotoperiodo favorece en el crecimiento de yemas asexuales o vegetativas las cuales son las hojas y los estolones, el segundo fotoperiodo favorece el crecimiento de yemas sexuales o fructíferas (Morales et al., 2017).

## 2.6 Descripción botánica

De acuerdo con Olivera (2012) la descripción botánica del cultivo de fresa es:

**Estolón:** son de bajo porte y logran alcanzar una altura de hasta 0,40 m de altura.

**Raíz:** sistema radicular fasciculado está constituida por raíces y raicillas, las primeras presentan un cambium vascular y suberoso, las segundas se van reanudando fisiológicamente. Alcanza una profundidad de 40 cm mientras que el 90% de este sistema radicular se encuentra entre los 25 cm (Loeza, 2018).

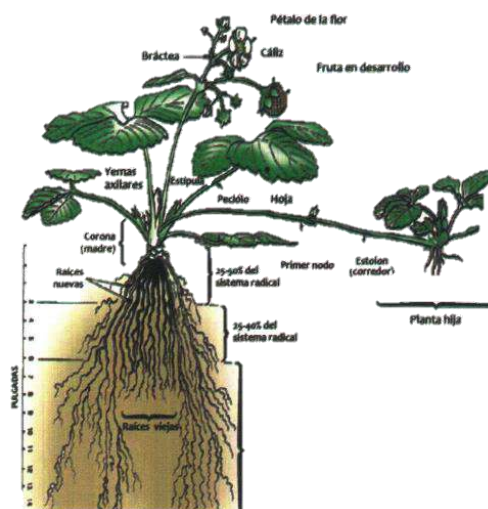
**Tallo:** es corto y tiene forma cónica llamado corona, donde se desarrollan una numerosa cantidad de hojas que protegen a la zona de crecimiento (Loeza, 2018).

**Hojas:** estas aparecen en roseta y se insertan en la corona, son largamente pecioladas y proporcionadas de dos estipulas rojizas. Su limbo está dividido en tres folíolos pediculados, de bordes aserrados, y debido a que poseen un gran número de estomas pueden perder gran cantidad de agua por transpiración. Las yemas axilares de las

hojas nuevas dan origen a estolones de longitud y tamaño variable según sean las condiciones de manejo del cultivo, clima y variedad.

**Flores:** generalmente son perfectas o hermafroditas, pero también presentan flores unisexuales y diclinas, se presentan en inflorescencias cimosas de tipo bíparo o solitarios que sobresalen de las hojas que quedan protegidas por ella. Las inflorescencias pueden desarrollarse partiendo de una yema terminal de la corona, o de yemas axilares de las hojas. La flor posee de 5 a 6 pétalos, de 20 a 35 estambres y varios cientos de pistilos sobre un receptáculo carnoso.

**Fruto:** de cada óvulo fecundado deriva un fruto de tipo aquenio, el desarrollo de los aquenios distribuidos por la superficie del receptáculo carnoso, estimula el crecimiento y coloración del mismo, dando lugar al fruto de la fresa.



**Figura 2.2-** Morfología y partes de la planta de fresa (Bonilla et al., 2011).

## 2.7. Enfermedades del cultivo de fresa presentes en la corona del cultivo

### 2.7.1. Marchitamiento por *Fusarium*

El hongo patógeno *Fusarium oxysporum* ha sido relacionado con la marchitez de fresa desde 1965. Es entonces que se han llevado a cabo caracterizaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares del patógeno y se ha mantenido vigente que es la forma especial *fragariae* la que ocasiona la pudrición de la corona y raíz de la fresa (Henry et al., 2021).



**Figura 2.3-** Daños en el cultivo de fresa por *Fusarium* (Koike y Bolda, 2013).

Koike y Bolda (2013) mencionan que esta enfermedad es causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. La presencia del patógeno la favorecen las altas temperaturas, presentando una marchitez de follaje, así mismo se secan y mueren las hojas más viejas. En el cuello de la planta y en los tejidos vasculares se presenta un color anaranjado. Este patógeno se vuelve más agresivo si se presentan condiciones como el estrés hídrico, además logra sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo y se puede propagar por el viento, y por la lluvia. Para evitar la propagación del patógeno se han realizado diversas actividades como lo son la rotación de cultivos, la fumigación antes del trasplante y evitar el estrés hídrico en los cultivos para así disminuir la presencia de estos patógenos.

La presencia de este patógeno generalmente se encuentra en climas cálidos, por lo tanto, es muy rara la presencia de este en climas fríos, logran sobrevivir por largo tiempo ya que presentan una fase saprofita por lo tanto su tiempo es totalmente desconocido. Las raíces principales de las plantas jóvenes infectadas con *Fusarium* muestran al principio una mancha ligeramente rojiza, que posteriormente adquiere una tonalidad que va de rojo oscuro a pardo y se extiende hasta cubrir la raíz principal y la porción del tallo que se encuentra por debajo de la superficie del suelo. De manera general el crecimiento de la planta infectada se retarda y cuando el clima es seco las hojas pueden tornarse amarillas e incluso llegan a desprenderse de la planta y en la mayoría de los casos las plantas infectadas decaen y mueren presenten o no síntomas de marchitez (Agrios, 2005).



**Figura 2.4-** Tejido de la corona infectado por *Fusarium* (Koike y Bolda, 2013).

### **2.7.2. Marchitamiento por *Verticillium***

La marchitez por *Verticillium* es provocada por la especie *V. dahliae*. Tiene una patogenicidad muy amplia pudiendo habitar en más de 400 especies entre plantas leñosas, anuales, perennes y herbáceas (SENASICA, 2018). Logra vivir en el suelo durante varios años como micro esclerocios, logrando vivir en condiciones extremas como lo son las altas temperatura y la falta de humedad en el suelo. Infecta a la planta a través del sistema radicular donde hay heridas que permiten la entrada de este hongo (Bolda, 2011). Los síntomas que provoca son similares a los de *Fusarium* a diferencia

que *Verticillium* se desarrolla en temperaturas más bajas y los síntomas tardan más en presentarse, donde prefiere temperaturas entre 25 y 32°C para que se pueda desarrollar rápidamente y provocar una rápida diseminación (Agrios, 2005).



**Figura 2.5-** Síntomas presentes en el área del follaje vegetal a causa de *Verticillium* (Bolda, 2011).

Pérez et al. (2007) mencionan que las plantas de fresa afectadas por este patógeno presentan inicialmente necrosis marginales e intervenales de las hojas basales, mientras que las hojas internas se suelen mantener verdes y turgentes hasta que la planta finalmente colapsa. En el caso de plantas inoculadas artificialmente con el patógeno se puede observar que la formación de raíces nuevas se limita con la infección y las raíces ya existentes se encuentran completamente necrosadas.



**Figura 2.6-** Síntoma en el tejido interno causado por *Verticillium* (Bolda, 2011).

### 2.7.3. Marchitamiento por *Rhizoctonia*

Pérez et al. (2007) asocian a *R. fragariae* como la causante de la enfermedad podredumbre de la raíz en fresa. Las lesiones causadas por este patógeno se localizan en las raíces alimenticias y en las raíces estructurales. En cuestión de sintomatología, se presenta necrosis en tonos rojizos, marrones y al final negros, la raíz se encuentra encharcada y termina desintegrándose. Al desintegrarse las raíces hace que las plantas se presenten débiles y por ende se generan pérdidas de producción.

El género *Rhizoctonia* es uno de los patógenos transmitidos por el suelo más destructivos y causante de pérdidas bastantes significativas en el cultivo de fresa. Las especies más reconocibles de este género son *R. solani* y *R. fragariae*. En las plantas más viejas. Este patógeno se considera un problema importante en la producción de comercial de fresa a nivel mundial y es clasificado según su condición nuclear celular (Azad y Abdulla, 2017). Es un patógeno difícil de controlar debido a la alta tasa de supervivencia de la esclerotina en el suelo en condiciones adversas y el amplio rango de hospedantes (Sekmen et al., 2021).

El hongo puede entonces infectar raíces estructurales o alimentadoras, en especial cuando la planta está bajo estrés o sus raíces estén dañadas. *Rhizoctonia* pertenece al grupo de hongos superiores y a la clase agonomycetes, causa pudrición de color café que llega a la parte central de la raíz y del tallo, por lo tanto, estos tejidos llegan al punto en el que se secan y avanza hasta el punto de llegar a la pudrición de la corona (Agrios, 2005).



**Figura 2.7-** Tejido interno de la corona infectado por *Rhizoctonia* (Obregón et al, 2020).

#### **2.7.4. Marchitamiento por *Phytophthora***

El género *Phytophthora* es el causante de la enfermedad del tizón tardío de la papa y en otras especies ocasiona principalmente pudriciones de raíz. El patógeno suele atacar primero al tallo de la planta por debajo de la superficie del suelo o bien la raíz principal y producir síntomas similares a los generados por una sequía y el marchitamiento general de los órganos aéreos de la planta antes de que aparezcan canchales o lesiones directas por arriba de la superficie del suelo. La invasión de la raíz se inicia a nivel de la región de la corona o nivel de la superficie del suelo. Las especies de *Phytophthora* que producen este tipo de enfermedades viven y se reproducen principalmente en el suelo y por lo general atacan a plantas susceptibles a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella (Agrios, 2005). Las principales especies que atacan el cultivo son *P. cactorum* y *P. fragariae* que esta última ocasiona la podredumbre roja (Cano, 2013).

Iribarren et al. (2012) asocian al patógeno *Phytophthora cactorum* como el agente causal de la podredumbre seca que produce pérdidas en los cultivos de frutilla. Este patógeno persiste como oosporas formadas principalmente en los frutos afectados, los que permanecen en la superficie de suelo. Cuando el inóculo tras fuertes lluvias o

salpicaduras de agua, llega desde el suelo hasta la superficie (Pérez et al., 2007). Uno de los principales retos en el desarrollo del cultivo de fresa, e incluso en la post Cosecha de la fruta, es el manejo de enfermedades que son en su mayoría causadas por hongos.



**Figura 2.8-** Síntomas presentes en el cultivo de fresa con *Phytophthora* (Obregón et al., 2020).

#### **2.7.5. Pudrición de corona por *Neopestalotiopsis* spp.**

Chamorro et al. (2016) reportan al hongo *Neopestalotiopsis clavispora* como el causante de la pudrición de la corona y raíz en las plantas de fresa.

En México, los productores de fresa indicaron pérdidas de hasta un 50% de los trasplantes establecidos. Los síntomas de las plantas de fresa enfermas se asocian a los síntomas por *Neopestalotiopsis* sp., ya que las plantas infectadas presentan manchas pequeñas de color marrón oscuro, los pecíolos cuentan con unas lesiones hundidas de color café oscuro, que avanzan hacia la base del pecíolo alcanzando la corona y provocando la marchitez de las hojas, por su parte las raíces de las plantas enfermas eran de color oscuro. Las plantas que presentaron estos síntomas mostraron un crecimiento reducido y murieron aproximadamente 1 mes después de ser trasplantadas. El agente causal de la pudrición de la corona, pudrición de raíz y mancha foliar de los trasplantes de fresa es *Neopestalotiopsis rosae* (Rebollar et al., 2020).



**Figura 2.9-** Síntoma presente en el tejido interno del cultivo causado por *Neopestalotiopsis* (Obregón et al., 2020).

Borrero et al. (2018) al realizar el aislamiento del patógeno de plantas de arándano infectadas, identificaron que se trataba del hongo *Neopestalotiopsis clavispora*, el cual en medio de cultivo Agar de Papa y Dextrosa (PDA) se observó que el micelio aéreo era de color blanco y algodonoso, borde de la colonia ondulado, al reverso de la placa era de color amarillo claro y los acérvulos negros distribuidos en círculos concéntricos. Los conidios eran fusiformes o claviformes, rectos y mínimamente curvados. Las células basales eran cónicas y hialinas con un apéndice hialino de base.

Por su parte, Chamorro et al. (2016) indican que en medio de cultivo PDA las colonias fúngicas eran de color blanco y algodonosas, los acérvulos eran de color negro y concéntricos a los 10 días después del aislamiento. Los conidios eran fusiformes a elipsoides con cinco células, las apicales y las basales eran hialinas, la tercera y cuarta célula eran de color marrón desde la base. Los conidios contaban con un apéndice basal y de dos a cuatro apéndices apicales.

*Neopestalotiopsis clavispora* puede desarrollarse a temperatura ambiente en un rango de entre 20 y 25°C, y una humedad regular de 95 a 100% (Dung et al., 2016).



**Figura 2.10-** Síntomas presentes en el área del follaje (Obregón et al., 2020).

#### 2.7.5.1. Clasificación taxonómica de *Neopestalotiopsis*

De acuerdo a Obregón et al. (2018), la clasificación taxonómica del género *Neopestalotiopsis* es la que se presenta en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2-** Clasificación taxonómica de la *Neopestalotiopsis*.

| Taxón    | Clasificación            |
|----------|--------------------------|
| Reino:   | Fungi                    |
| Filo:    | Ascomycota               |
| Clase:   | Deuteromycetes           |
| Orden:   | Amphisphaeriales         |
| Familia: | Pestalotiopsidaceae      |
| Género:  | <i>Neopestalotiopsis</i> |

#### 2.7.5.2. Sintomatología

El principal síntoma se observa en las hojas con zonas intervenales necróticas rojizas, áreas de color oxido en hojas más viejas principalmente, comienzan desde los márgenes y cubren toda la hoja a medida que se desarrolla la enfermedad. La planta se marchita y las hojas más viejas quedan necróticas. En la corona aparecen áreas de color marrón oscuro, que son visibles en cortes longitudinales. Las plantas pueden

morir si la infección es grave, en particular aquellas plantas pequeñas o que han sufrido algún tipo de estrés (Obregón et al., 2020).

## **2.8. Métodos de control de enfermedades**

### **2.8.1. Control físico**

El control físico se basa en la elevación temporal de la temperatura del suelo antes o durante el cultivo, con el fin de lograr la desinfección del mismo. Los métodos más usados son la desinfección con vapor de agua y la solarización del suelo. El primero se fundamenta por ser un excelente medio para transmitir el calor y suele aplicarse en pequeñas superficies, fundamentalmente en invernaderos, para eliminar los patógenos instalados previamente al inicio del cultivo. El segundo método consiste en que aprovecha la energía solar para aumentar la temperatura del suelo húmedo como alternativa de desinfección mediante fumigantes. Esta última puede ser respetuosa con el medio ambiente y aplicable tanto en suelo desnudo, como en cultivo establecido de árboles leñosos, sin afectar a su desarrollo vegetativo (López y Melero, 2020).

### **2.8.2. Control cultural**

El control cultural de patógenos es una estrategia para prevenir la propagación de enfermedades, que puede estar presentes. Este ayuda de manera en que no provocamos cambios perjudiciales en el agroecosistema de una manera negativa. En este método de control se encuentran diferentes actividades como la preparación del terreno donde se lleva a cabo la desinfección del mismo. La mayoría de estas prácticas evitan que el cultivo entre en contacto con el patógeno y así eludir una diseminación mayor y prevenir su dispersión, de igual manera, algunas prácticas también llegan a provocar resistencia del hospedante o el crecimiento del mismo (Agrios, 2005).

### **2.8.2. Control químico**

El control químico es una medida para el control de patógenos, el cual es el más utilizado, debido a su eficiencia y control rápido, ha provocado su uso desmedido, por lo tanto, causa hasta cierta parte una resistencia en el control, así mismo originando problemas ambientales y en los productos a cosechar, dejando residuos químicos de la aplicación de estos fungicidas, todo esto debido a un uso excesivo en el número de aplicaciones o en las dosis. Para estas aplicaciones se deben tener métodos de seguridad para la buena aplicación y el cuidado del aplicador (Trapero, 2011).

### **2.8.3. Control biológico**

El control biológico de fitopatógenos se encuentra planteado como una estrategia potencial de control en los últimos años, esto a causa de que el control químico genera una acumulación de residuos químicos nocivos para la salud, además de que provocan daños ecológicos demasiado graves (Nega, 2014). El control biológico se entiende como la destrucción total o parcial de las poblaciones de patógenos por medio de otros organismos que solos o en combinación con otros son capaces de disminuir los efectos que ocasiona el patógeno. Esto sucede de manera frecuente en la naturaleza, debido a que existen algunas enfermedades en las que el patógeno no puede desarrollarse en determinadas áreas debido a que el suelo contiene microorganismos antagónicos al patógeno “suelo supresor”, así mismo las plantas que son atacadas por el patógeno, también han sido inoculadas de manera natural con microorganismos antagónicos antes o después del ataque del patógeno (Agrios, 2005).

Vinchira y Moreno (2019) señalan que el objetivo del uso de microorganismos biocontroladores es limitar la aplicación de agroquímicos disminuyendo la presencia del patógeno en el cultivo de manera que se evite el deterioro del medio ambiente. Esta estrategia de manejo de patógenos que atacan los cultivos depende a grandes rasgos de las interacciones entre la planta, el patógeno, el organismo biocontrolador y el ambiente en el cual se lleva a cabo la interacción.

## 2.9. *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico

### 2.9.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con el National Center for Biotechnology Information (NCBI,2023), la clasificación del género *Trichoderma* es la que se presenta en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3-** Clasificación taxonómica de *Trichoderma harzianum*.

| Taxón    | Clasificación      |
|----------|--------------------|
| Reino    | Fungi              |
| División | Ascomycota         |
| Clase    | Sordarimycetes     |
| Orden    | Hypocreales        |
| Familia  | Hypocreaceae       |
| Género   | <i>Trichoderma</i> |
| Especie  | <i>harzianum</i>   |

### 2.9.2. Descripción general

Sivila y Álvarez (2013) indican que el género *Trichoderma* fue identificado en 1871 y ha sido ampliamente estudiado, se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces y rápidamente las coloniza. Debido a que posee una alta capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, este microorganismo puede ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos para su multiplicación. *Trichoderma* sp. es un hongo anaerobio facultativo, y la mayoría de las colonias al principio tienen un color blanco, después se cambia a verde oscuro o amarillento, en consecuencia, de una densa esporulación.

Chiriboga et al. (2015) mencionan que el hongo *Trichoderma* spp., inhibe el desarrollo de los hongos o nematodos causantes de enfermedades en las plantas, entre ellas la fresa. Se trata de un hongo que actúa de diversos mecanismos en los que se incluye la competencia de nutrientes, hiperparasitismo y la antibiosis de los patógenos. Es así como este hongo antagonista tiene la capacidad de tomar los nutrientes de los hongos patógenos, además compite con ellos e incluso los degrada. Este hongo requiere de humedad para poder germinar, además tiene una velocidad bastante alta de crecimiento, por lo que es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades que afectan a los cultivos. Este microorganismo actúa contra diversos hongos fitopatógenos transmitidos por suelo y aire, usado contra pudriciones en un amplio rango de especies, que son causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y algunos otros patógenos formadores de esclerocios como *Sclerotinia* y *Sclerotium*.

### **2.9.3. Ciclo biológico**

El ciclo biológico de *T. harzianum* comienza cuando el organismo crece y se ramifica como una hifa fúngica. La esporulación asexual sucede cuando las esporas son liberadas a gran número. También pueden formarse clamidosporas intercaladas, de manera individual o algunas veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar (Romero et al., 2009).

### **2.9.4. Mecanismos de acción**

#### **2.9.4.1. Competencia**

Uno de los mecanismos de acción de *Trichoderma* es la competencia, en la cual este hongo antagonista compite por espacio y nutrientes con el patógeno. Esto es posible gracias a que este hongo es capaz de crecer a velocidades más aceleradas que el patógeno y por ende al colonizar con mayor velocidad los espacios de suelo y rizosfera, limita la multiplicación del patógeno (Martínez et al., 2008).

Infante et al. (2009) definen a la competencia como un mecanismo en el cual al menos dos organismos compiten ya sea por espacio o nutrientes, esto debido a que alguno

de los organismos es más rápido en su crecimiento o en la extracción de nutrientes del sustrato a comparación del otro organismo.

#### **2.9.1.2. Micoparasitismo**

El antagonismo puede intervenir simplemente usando el patógeno como fuente de alimento, es decir, si el patógeno es un hongo y el antagonista un micoparásito habitualmente es capaz de romper la pared celular del hospedador con quitinasa o glucanasa, o bien si el patógeno es un oomiceto además necesita celulasas. Los micoparásitos mejor conocidos son los del género *Trichoderma*, las hifas de este hongo penetran tanto las estructuras de supervivencia como esclerocios o hifas en estado de crecimiento, además se enrollan alrededor del hospedador y en determinados puntos penetran en el atravesando la pared y membrana celulares, en otros casos el micoparásito se enrolla alrededor del hospedador y produce su muerte sin haber señales de penetración de la pared celular (Rubio y Fereres, 2005).

Este mecanismo de acción inicia cuando las hifas *Trichoderma* se enrollan a las hifas del hospedante e intervienen en su crecimiento, posteriormente las paredes celulares del hospedante son degradadas por enzimas producidas por el hongo antagonista y finaliza con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del patógeno (Ezziyyani et al., 2004).

#### **2.9.1.3. Antibiosis**

La antibiosis se basa en la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles o también conocidos como antibióticos, que son encargados de inhibir el desarrollo de organismos patógenos sin necesidad de haber un contacto (Reino et al., 2008). *Trichoderma* es un hongo que produce sustancias tóxicas para otros microorganismos, sin embargo, puede que suceda lo mismo que al utilizar fungicidas sintéticos ya que existe la posibilidad de que algunos microorganismos generen un tipo de resistencia a ellos, por lo que es recomendable no considerar este mecanismo como única opción para el control biológico (Vero y Mondino, 1999).

#### 2.9.1.4. Inducción de resistencia

Algunas especies de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en plantas. Con esto se pueden controlar a patógenos que estén distantes del lugar donde se encuentra establecido el antagonista (Martínez et al., 2013).

Harman et al. (2004), mencionan que cuando las esporas de *Trichoderma* son agregadas al suelo colonizan las raíces de la planta, así mismo este hongo produce compuestos que ocasionan que la planta se defienda, como péptidos y proteínas.

El hongo antagónico *T. harzianum* induce mecanismos de resistencia en plantas de pepino, al aumentar las actividades peroxidasa y quitinasa en dichas plantas (Yedidia et al., 1999).

## 2.10 *Beauveria bassiana* como agente de control biológico

### 2.10.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con NCBI (2023), la clasificación del género *Beauveria* es la que se observa en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4-** Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana*.

| Taxón    | Clasificación    |
|----------|------------------|
| Reino    | Fungi            |
| División | Ascomycota       |
| Clase    | Sordariomycetes  |
| Orden    | Hypocreales      |
| Familia  | Cordycipitaceae  |
| Género   | <i>Beauveria</i> |
| Especie  | <i>bassiana</i>  |

### **2.10.2. Descripción general**

*B. bassiana* se caracteriza morfológicamente por que la colonia se observa algodonosa y polvosa debido a los abundantes conidios, al principio el color es blanco y al envejecer se torna amarillenta en la parte central, la textura es blanda y su superficie es plana. Esta especie cuenta con hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos agrupados de manera irregular, las fiálides se encuentran hinchadas en la base y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas. Los conidios de *B. bassiana* son hialinos y lisos con forma globosa a elipsoidal (García et al., 2011). Por su parte, Chiriboga et al. (2015) indican que este hongo posee un micelio septado, conidióforos de 1 a 2 micras de diámetro, de los cuales nacen conidios o esporas hialinas redondas y ovaladas de 2 a 3 micras de diámetro, que se insertan en el raquis.

### **2.10.3. Ciclo biológico**

El ciclo de vida de *B. bassiana* se compone en dos fases, las cuales son: patogénica y saprofítica. La fase patogénica se divide en cuatro pasos: adhesión, germinación, diferenciación y penetración. El proceso de infección se inicia con la unión de los conidios del hongo a la cutícula del insecto. Los conidios del entomopatógeno se adhieren, germinan y penetran al insecto en las regiones intersegmentales del mismo donde la composición y estructura es más sensible que el resto del tegumento del insecto. La fase saprofítica tiene lugar dentro del hemocèle, con un crecimiento prolífico del hongo. El hongo invade los tejidos y en consecuencia da lugar a la muerte del hospedante. Después de la muerte ocurre una fase de crecimiento micelial hacia el exterior que finaliza con la producción de nuevos conidios sobre la superficie del insecto (Carballo y Guharay, 2004).

### **2.10.4. Mecanismos de acción**

*Beauveria bassiana* presenta un efecto protector en las plantas frente a fitopatógenos o inhibiendo el crecimiento micelial, ya que este entomopatógeno produce enzimas

quitinasas, amilasas, proteasas y lipasas. Tiene la capacidad de vivir en materia orgánica o de infectar a otro organismo vivo y puede vivir todo su ciclo de vida colonizando los tejidos sin causar algún daño evidente (Peteira et al., 2011).

*B. bassiana* actúa a través de la degradación de la quitina de los fitopatógenos que está presente en la pared celular de estos, ya que este hongo benéfico libera diferentes enzimas entre las cuales destacan las quitinasas. Las enzimas quitinasas facilitan la infección del hongo, desde la germinación de la conidia, el crecimiento de las hifas y la penetración de estas en el organismo afectado (Flórez et al., 2005).

## 2.11 *Metarhizium anisopliae* como agente de control biológico

### 2.11.1. Clasificación taxonómica

De acuerdo con Barrera (2013), la clasificación taxonómica del hongo *Metarhizium* es la que se presenta en la Tabla 2.5.

**Tabla 2.5-** Clasificación taxonómica de *Metarhizium anisopliae*.

| Taxón    | Clasificación      |
|----------|--------------------|
| Reino    | Fungi              |
| División | Myco               |
| Clase    | Deuteromycetes     |
| Orden    | Hypocreales        |
| Familia  | Clavicipitaceae    |
| Género   | <i>Metarhizium</i> |
| Especie  | <i>anisopliae</i>  |

### **2.11.2. Descripción general**

La coloración de la colonia va desde el verde oliva hasta el verde oscuro, esto debido a la maduración de los conidios, la superficie es plana y textura variable, con un aspecto lanoso. Las cepas cuentan con hifas cenocíticas y lisas, con conidios de diferente color desde verde oliva hasta verde oscuro, al principio el color que predomina es el verde oliva para posteriormente tornarse de verde oscuro. Además, los conidios poseen extremos redondeados, lisos y agrupados en cadenas regulares debido a la agregación por elongación de los conidios (García et al., 2011).

### **2.11.3. Ciclo biológico**

El ciclo biológico de este entomopatógeno está compuesto por una fase infectiva y una saprofita, en las cuales el hongo se desarrolla al interior del hospedero y posteriormente comienza a esporular cuando se alimenta de los nutrientes de los restos del insecto (Khachatourians y Qazi, 2008). Acuña et al. (2015) mencionan que este hongo infecta la cutícula del hospedero al existir un tipo de contacto entre ellos.

La fase infectiva inicia cuando la espora de *M. anisopliae* se adhiere a la cutícula del insecto para después penetrarla con la producción de enzimas proteasas, lipasas y quitinasas, después de esto el hongo comienza a colonizar el interior del insecto al formar colonias y estructuras reproductivas (Hajek y Leger, 2003).

### **2.11.4. Mecanismos de acción**

Los hongos entomopatógenos presentan una ventaja en cuanto a mecanismos de acción frente a las bacterias y a los virus debido a que estos deben de ser ingeridos por los insectos, mientras que estos controladores biológicos pueden ingresar por contacto a través de un proceso de infección en la cutícula del insecto (Acuña et al., 2015).

*Metarhizium anisopliae* es uno de los principales hongos entomopatógenos que inician su proceso de infección cuando germina la conidia y penetra la cutícula del insecto (Flórez et al., 2005).

## **2.12 Interacción de hongos benéficos frente a *Neopestalotiopsis***

### **2.12.1 Interacción *Beauveria bassiana*-*Neopestalotiopsis***

*Beauveria bassiana* es un hongo asexual que tiene un modo de acción a través de la degradación de la quitina en la pared celular de los hongos patógenos en el cual su mecanismo de acción involucra la producción de diferentes enzimas entre ellas la quitinasa encargada de la degradación y de igual manera genes de quitinasas (Paredes et al., 2016). Por su parte, Ownley et al. (2008) indican que la colonización endófitica de plántulas de tomate y algodón con *B. bassiana* genera una mayor protección contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Pythium myriotylum*.

### **2.12.2 Interacción *Metarhizium anisopliae*-*Neopestalotiopsis***

*Metarhizium anisopliae* es un hongo asexual que produce enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas, entre otras), estas enzimas provocan la degradación de la cutícula de los insectos o bien la pared celular de los hongos fitopatógenos que al igual que los insectos esta constituida por quitina (Valle-Ramírez et al., 2021). Picardal et al. (2019) obtuvieron un valor de 31.27% al evaluar el porcentaje de inhibición que tiene *M. anisopliae* frente *Fusarium oxysporum*. Al observar la región de interacción de *M. anisopliae* con *F. oxysporum* observaron que el micelio del hongo antagonista crecía en la superficie del patógeno, siempre enroscándose alrededor de sus micelios y después penetra la pared celular del fitopatógeno sin formación de estructuras opresoras.

### **2.12.3 Interacción *Trichoderma harzianum*-*Neopestalotiopsis***

*Trichoderma harzianum* es un hongo asexual que se caracteriza por su alta capacidad de crecimiento, su gran producción de esporas y enzimas (celulasas, quitinasas, entre algunas otras) que degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos. El controlador biológico *T. harzianum* se emplea en confrontación directa con hongos

patógenos mediante múltiples mecanismos de acción como la competencia, micoparasitismo, antibiosis e inducción de resistencia, así mismo la producción de metabolitos. Este actúa contra hongos y bacterias (Verma et al., 2007). Elad et al. (1983) mencionan que las hifas de *Trichoderma* suelen enrollarse alrededor del micelio del patógeno, para posteriormente penetrar su pared celular mediante la degradación de la misma. De acuerdo con Moreno-Velandia et al. (2018), el hongo antagónico *Trichoderma* es capaz de detectar a sus hospederos sin haber existido un contacto físico, debido a que puede detectar sustancias liberadas por el patógeno. Después de esto sus hifas se adhieren, enrollan y penetran la pared celular del fitopatógeno, para finalmente provocar su muerte mediante la producción de metabolitos secundarios con acción fungicida.

### **III. METODOLOGÍA**

## 3.1 Establecimiento del proyecto

### 3.1.1 Localización

El proyecto se estableció en el Instituto Tecnológico Superior de Abasolo situado en el municipio de Abasolo, Guanajuato. Las coordenadas de este son Latitud: 20°26'27.7"N y Longitud: 101°32'44.3"W.

Durante el desarrollo del proyecto se presentó una humedad relativa promedio de 41%, la mayor humedad relativa que se presentó fue de 31% mientras que la mayor fue de 55%. La temperatura promedio que se presentó fue de 32°C, la temperatura más alta fue de 39.3°C mientras que la más baja fue de 24°C.



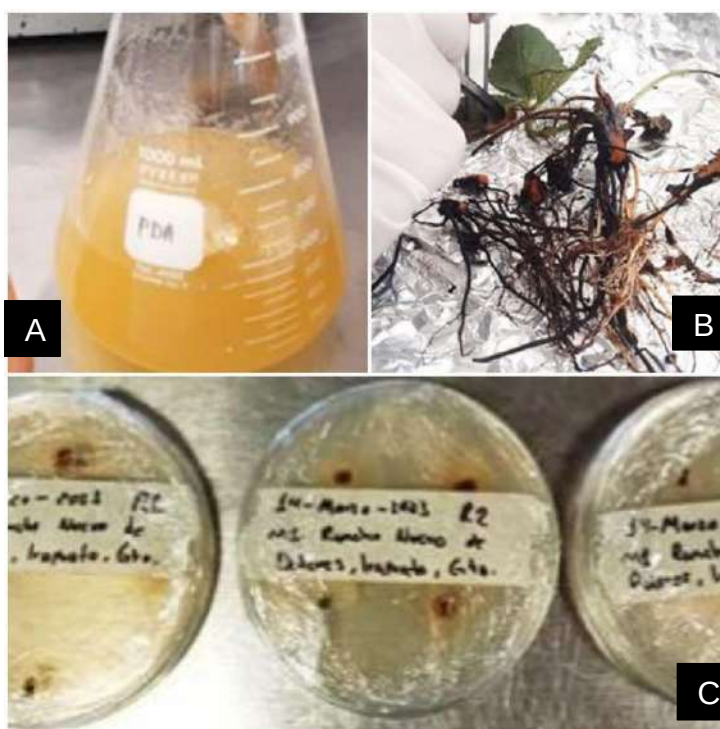
**Figura 3.1-** Localización del proyecto en la etapa *in vivo* (Google Earth, 2023).

### 3.1.2 Tipo de suelo y clima

Los tipos de suelo en el municipio de Abasolo son: vertisol con un 86,89%, phaeozem con 6,37% y leptosol con 4,80%. Mientras que el clima es semicálido subhúmedo con lluvias en verano de menor humedad (96,42%) y templado subhúmedo con lluvias de verano de menor humedad (3,58) (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2010).

## 3.2 Aislamiento del patógeno

El aislamiento del patógeno se realizó en medio de cultivo PDA de la marca BIOXON®, el cual fue preparado de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante en el contenedor del producto. El aislamiento del patógeno se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Agrios (2005), en la cual el aislamiento se genera a partir de material vegetal infectado (Figura 3.2). Al inicio del aislamiento se realizaron cortes del borde de la lesión y se colocaron en una solución de cloro al 10% durante un minuto y se realizó un doble enjuague con agua destilada estéril que posteriormente se colocaron en papel absorbente estéril, con el fin de retirar el exceso de humedad en el tejido vegetal. Se utilizaron pinzas estériles para trasladar los cortes en cajas de Petri con el medio de cultivo. Las cajas se sellaron con plástico adherentes y se incubaron a 28°C durante 3 días para inducir el crecimiento del hongo fitopatógeno en el medio de crecimiento artificial.



**Figura 3.2-** A) Preparación de medio de cultivo PDA en el área de laboratorio, B) Selección de material vegetal infectado para el proceso de aislamiento y C) Crecimiento fúngico de interés para el proyecto de investigación.

### 3.2.1 Purificación

Después de haber obtenido crecimiento fúngico en el medio de cultivo, se prosiguió a realizar la purificación del patógeno, para ello se realizaron cortes en los extremos del crecimiento del hongo y se colocaron en nuevas cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Una vez observados los crecimientos fúngicos, se seleccionaron aquellos que contaban con características de interés y se realizaron las purificaciones de estos microorganismos en cajas Petri con medio de cultivo PDA, con el fin de permitir que se desarrollaran de manera individual y observar si los crecimientos fúngicos correspondían a la cepa patógena de interés para este proyecto de investigación.



**Figura 3.3-** Crecimiento de cepa patógena.

### 3.2.2 Identificación

Para llevar a cabo la identificación morfológica del patógeno se colocó una gota de agua destilada sobre un porta objetos y se tomó una muestra del crecimiento fúngico de *Neopestalotiopsis*, posterior a esto se realizó un frotis con la muestra del crecimiento fúngico, para poder observar al microscopio a una vista de 10x, 40x y 100x, y poder observar su estructura e identificar el patógeno.



**Figura 3.4-** Conidios de *Neopestalotiopsis* observados al microscopio.

### **3.2.3 Mantenimiento de la cepa**

El microorganismo se resembró en medio de cultivo PDA para su mantenimiento y para tener disponibilidad del agente patógeno según se requiera en los diferentes puntos de la investigación.

## **3.3 Diseño experimental y tratamientos**

El experimento *in vivo* se realizó mediante un diseño de bloques completamente al azar, el cual está formado por 5 tratamientos con 3 repeticiones cada uno (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma harzianum*, testigo sano, testigo enfermo) (Tabla 3.1), cada repetición tuvo una cantidad de 5 plantas. La cantidad total de plantas evaluadas en el experimento fue de 75.

**Tabla 3.1-** Tratamientos en el experimento *in vivo*.

| Número de<br>tratamientos | Abreviatura | Descripción          |
|---------------------------|-------------|----------------------|
| 1                         | T1          | Testigo sano         |
| 2                         | T2          | Testigo enfermo      |
| 3                         | T3          | <i>T. harzianum</i>  |
| 4                         | T4          | <i>M. anisopliae</i> |
| 5                         | T5          | <i>B. bassiana</i>   |

En la Tabla 3.2 se observa la distribución de los tratamientos a evaluar en campo. Mientras que en la Figura 3.5 se observa de igual manera la distribución de los tratamientos en campo.

**Tabla 3.2-** Distribución de los tratamientos en campo.

|    |    |    |
|----|----|----|
| T5 | T3 | T4 |
| T1 | T2 | T5 |
| T2 | T4 | T3 |
| T4 | T1 | T1 |
| T3 | T5 | T2 |



**Figura 3.5-** Distribución de los tratamientos en campo.

### 3.4 Especie evaluada

En la realización de este proyecto, se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) de la variedad San Andreas (Figura 3.6).



**Figura 3.6-** Planta de fresa variedad San Andreas (A y B).

### 3.5 Establecimiento del área de trabajo

Se estableció un invernadero con medidas de 3 metros de ancho y 3 metros de largo, este se cubrió con plástico en la parte superior y en los laterales se colocó malla antiáfidos para una mayor aireación. Las bases del mismo se clavaron aproximadamente a 30 cm para una mayor resistencia.



**Figura 3.7-** Establecimiento del área de trabajo (A y B).

### 3.6 Desinfección del suelo y materiales de trabajo

La desinfección del suelo se llevó a cabo mediante el proceso de biosolarización, para el cual se utilizó un fungicida formulado a base de extracto de pino. La dosis que se empleó fue la especificada por el fabricante en la ficha técnica del producto.



**Figura 3.8-** Aplicación del producto al suelo para el proceso de biosolarización.

La desinfección del material para la estructura se realizó mediante la aplicación de peróxido de hidrogeno (5 ml por L de agua), esto para eliminar cualquier microorganismo que pudiera estar presente en la estructura y materiales utilizados en el experimento.



**Figura 3.9-** Desinfección del área de trabajo (A). Desinfección de materiales utilizados en el experimento (B).

## 3.7 Preparación de material vegetal

Una vez preparada la bolsa con suelo se llevó a cabo el trasplante, para ello la planta se sumergió en agua con Propamocarb + Fosetil (1 ml por cada litro de agua) durante 5 segundos para prevenir enfermedades. Se colocó una planta por cada bolsa.

## 3.8 Manejo de cultivo

### 3.8.1 Riego

La aplicación del riego a las plantas evaluadas fue de manera manual, se aplicó el agua necesaria dependiendo las condiciones climáticas que estén presentes, para así evitar algún tipo de estrés por falta de agua en la planta y proporcionarle un óptimo

desarrollo. Al momento de aplicar el riego tuvo cuidado para evitar dañar las raíces de las plantas.



**Figura 3.10-** Aplicación de riego en las plantas de fresa.

### **3.8.2 Fertilización**

La aplicación de los fertilizantes se llevó a cabo mediante la disolución de los mismos en el agua de riego. La primera aplicación de fertilizante se realizó a los 8 días después del trasplante, después se realizaron aplicaciones en intervalos de 7 días. Las cantidades empleadas por aplicación fueron en base a las utilizadas por Santoyo y Martínez (2011), las cuales son: 5 g de nitrato de potasio, 5 g de nitrato de calcio, 5 g de sulfato de magnesio, 4 g de urea y 5 g de fosfato monopotásico.

### **3.8.3 Control de plagas**

Para el control de plagas se realizó un monitoreo constante en las plantas, el cual fue diariamente para así identificar la presencia de alguna plaga, tratarla a tiempo y utilizar el método de control más adecuado. La plaga que se identificó en el cultivo fue araña roja (*Tetranychus urticae*) (Figura 3.11).



**Figura 3.11-** Araña roja presente en el cultivo (*Tetranychus urticae*).

Para el control de la araña roja se utilizaron dos productos, uno de ellos fue Extracto de Aceite de Neem, del cual se realizaron tres aplicaciones en intervalos de 7 días con una dosis de 5 ml de producto en un litro de agua.

**Tabla 3.3-** Cálculos para aplicación de Neem.

| Extracto de Neem             |          |
|------------------------------|----------|
| Cantidad de<br>producto (ml) | Agua (L) |
| 5                            | 1        |
| 15                           | 3        |

El otro producto contiene (1s) metil-4-oxo-3, (z) penta. 2-4 dietil ciclopenten-2enil-(1R3R)-2,2 dimetil-3-(2-metil prop-1-enil) ciclopropano carboxilato, para el cual se realizaron 3 aplicaciones con intervalos de 5 días con dosis de 5 ml en 1 litro de agua.

**Tabla 3.4-** Cálculos para aplicación de Piretrinas naturales.

| Piretrinas naturales      |          |
|---------------------------|----------|
| Cantidad de producto (ml) | Agua (L) |
| 5                         | 1        |
| 15                        | 3        |

Las aplicaciones se realizaron hasta el punto de goteo. Estas aplicaciones se realizaron a las 9:00 horas (Figura 3.12).



**Figura 3.12-** Aplicación para el control de araña roja.

## 3.9 Inoculación de los tratamientos en el material vegetal

### 3.9.1 Inoculación de *Trichoderma harzianum*

Para la inoculación de *T. harzianum* en las plantas de fresa, se utilizó la dosis recomendada por el fabricante del producto, así como la cantidad de aplicaciones recomendadas por el mismo, en este caso se realizaron tres aplicaciones a la corona de la planta en intervalos de 7 días (Figura 3.13).



**Figura 3.13-** Inoculación de *T. harzianum* en las plantas de fresa.

**Tabla 3.5-** Cálculos para la aplicación de producto elaborado a base de *T. harzianum*.

| <i>Trichoderma harzianum</i> |             |
|------------------------------|-------------|
| Producto (g)                 | Espacio (m) |
| 500                          | 10000       |
| 0.09                         | 1.8         |

### 3.9.2 Inoculación de *Metarhizium anisopliae*

Para la inoculación de *M. anisopliae* en las plantas de fresa, se utilizó la dosis recomendada por el fabricante del producto, así como la cantidad de aplicaciones recomendadas por el mismo, en este caso se realizaron tres aplicaciones a la corona de la planta en intervalos de 7 días (Figura 3.14).



**Figura 3.14-** Inoculación de *M. anisopliae* en las plantas de fresa.

**Tabla 3.6-** Cálculos para la aplicación de producto elaborado a base de *M. anisopliae*.

| <i>Metarhizium anisopliae</i> |             |
|-------------------------------|-------------|
| Producto (g)                  | Espacio (m) |
| 500                           | 10000       |
| 0.09                          | 1.8         |

### 3.9.3 Inoculación de *Beauveria bassiana*

Para la inoculación de *B. bassiana* en las plantas de fresa, se utilizó la dosis recomendada por el fabricante del producto, así como la cantidad de aplicaciones recomendadas por el mismo, en este caso se realizaron tres aplicaciones a la corona de la planta en intervalos de 7 días (Figura 3.15).



**Figura 3.15-** Inoculación de *B. bassiana* en las plantas de fresa.

**Tabla 3.7-** Cálculos para la aplicación de producto elaborado a base de *B. bassiana*.

| <i>Beauveria bassiana</i> |             |
|---------------------------|-------------|
| Producto (g)              | Espacio (m) |
| 500                       | 10000       |
| 0.09                      | 1.8         |

### 3.10 Inoculación del patógeno en la planta

Para la correcta inoculación de *Neopestalotiopsis* en plantas de fresa, se utilizó la metodología desarrollada por Ángel-García et al. (2018), donde se utilizó plantas con un diámetro del cuello de la raíz mayor a los 6 mm y con 8 hojas, ejecutando los siguientes pasos:

1. La sección basal del tallo fue desinfectada con alcohol etílico al 70%.
2. Con ayuda del bisturí una vez desinfectado, se realizó un corte en el PDA de 20 mm<sup>2</sup>.
3. Empleando una navaja nueva para cortar papel, se realizó el corte del tallo de la planta en forma de bisel con 40% del diámetro en la corona, a 3 cm del suelo.
4. Sobre la herida se colocó el PDA con crecimiento del hongo patógeno.
5. Se cubrió con cinta utilizada en injertos, colocada a presión en la incisión con el material infeccioso inoculado.



**Figura 3.16-** A) Corte en la corona de la planta, B) Cinta para injertos utilizada para cubrir el corte en la corona de la planta, C) Corte en el PDA con la presencia del micelio del fitopatógeno y D) Colocación de la cinta en el área donde se realizó el corte.

### 3.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico Statgraphics, para ello se empleó un análisis de varianza para las variables evaluadas y poder determinar que tratamiento posee mayor efectividad en el control del patógeno. Se realizó con una prueba Tukey HSD con un nivel de confianza del 95%.

### 3.12 Variables de respuesta

Para la parte de la evaluación en campo de la investigación, las variables evaluadas son:

- Patogenicidad y virulencia.
- Mortalidad de las plantas.
- Eficacia de los productos (control con *Trichoderma*, *Metarhizium* y *Beauveria* frente a *Neopestalotiopsis*).

### 3.12.1 Patogenicidad y virulencia

La patogenicidad y virulencia indican si el patógeno estaba presente según los síntomas presentes en este, es por esto que se realizaron pruebas con los postulados de Koch, Fuentes (2007) menciona los siguientes:

1. El microorganismo debe estar presente en todo el ciclo de la enfermedad y debe de aislarse de organismos enfermos nunca de sanos.
2. Cuando un organismo está enfermo, el patógeno debe de aislarse en cultivo puro.
3. Si el patógeno se inocula en otro organismo la enfermedad debe de reproducirse.
4. El patógeno debe de aislarse del organismo infectado en cultivo puro.

Para la comprobación de los postulados de Koch se tomó una planta de cada tratamiento para comprobar que el patógeno que ocasionó la muerte de las plantas fue *Neopestalotiopsis* spp.



**Figura 3.17-** Aislados de la enfermedad de los postulados de Koch.

Se realizaron observaciones del grado de severidad de acuerdo al daño en las plantas infectadas mediante la realización de una escala con los síntomas descritos por (Rebollar et al., 2020).

**Tabla 3.8 – Virulencia de *Neopestalotiopsis* en el cultivo de fresa.**

| Grado de severidad | Descripción                               | Síntoma                                                                              |
|--------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                  | Planta sana                               |    |
| 1                  | Ligero amarillamiento en hojas exteriores |  |
| 2                  | Manchas necróticas concéntricas en hojas  |  |

3

Manchas negras en pecíolo



4

Hoja marchita y las más viejas  
presentan severa necrosis



5

Al abrirse la corona presenta áreas  
de color marrón rojizo



6

Muerte de la planta



### **3.12.2 Mortalidad de las plantas**

La mortalidad de las plantas consistió en contar cuantas plantas murieron una vez infectadas con el patógeno aun aplicando los tratamientos de control.

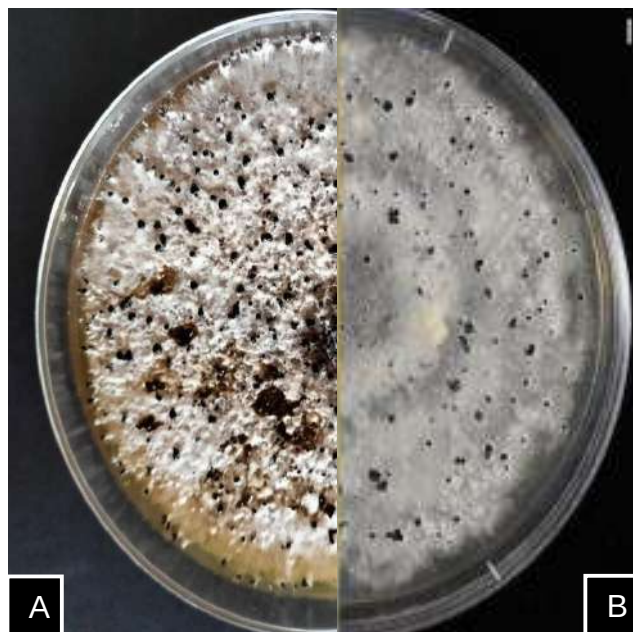
### **3.12.3 Eficiencia de los productos**

Una vez haciendo las aplicaciones de los tratamientos e inoculando la planta con el patógeno, se observaron los comportamientos en cada tratamiento y se registraron los datos en una bitácora cada 3 días para su posterior procesamiento y en base a ello, determinar cuál de las propuestas de cada tratamiento resulta ser la que presente un mejor porcentaje de control sobre las plantas infectadas con *Neopestalotiopsis*.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

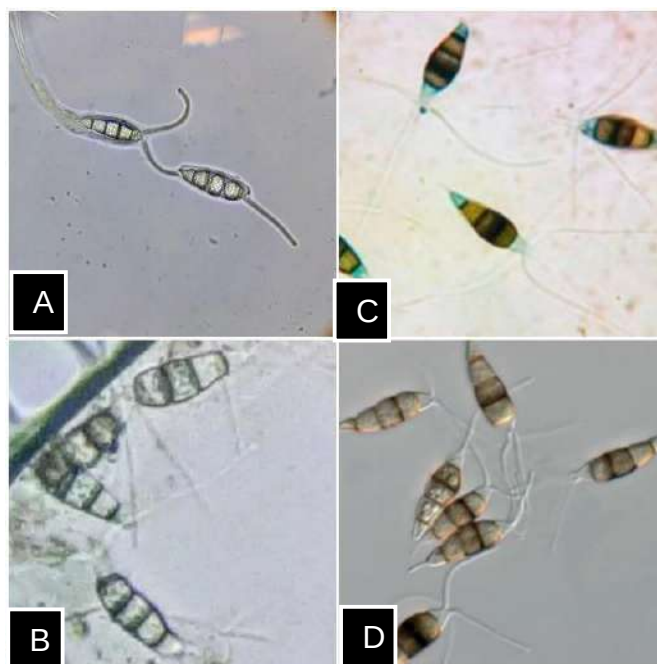
## 4.1 Identificación de *Neopestalotiopsis* spp.

El aislamiento del patógeno se obtuvo de una planta enferma con la sintomatología característica de la enfermedad.



**Figura 4.1-** Crecimiento de *Neopestalotiopsis* sp. en caja Petri con medio de cultivo PDA: (A) *Neopestalotiopsis* sp aislado de planta de fresa con sintomatología característica de la enfermedad y (B) *Neopestalotiopsis* sp. aislado en caja de Petri por Jayawardena et al. (2016).

Una vez purificado, el crecimiento fúngico presentó un crecimiento micelial color blanco y algodonoso, los acérvulos presentaron un color amarillo al principio y posteriormente se fue tornando un color negro, estas características coinciden con las reportadas por Borrero et al. (2018) y Jayawardena et al. (2016), para hongos del género *Neopestalotiopsis* spp.



**Figura 4.2-** Identificación de *Neopestalotiopsis* en microscopio: (A) Conidios libres en preparación de frotis, (B) Conidios inmaduros. De acuerdo con Morales-Mora et al. (2019) presentan: (C) Conidios libres y Jayawardena et al. (2016) muestran: (D) Conidios inmaduros.

En la Figura 4.2, se observan los conidios que presentan coloraciones diferentes varios de estos presentaron un color transparente mientras que otros presentaron un color marrón oscuro, dichas características se relacionan con lo reportado por Jayawardena et al. (2016) quienes al realizar la identificación morfológica de *Neopestalotiopsis* spp. observaron que los conidios eran marrón oscuro, debido a eso indican que son conidios maduros. Mientras tanto, se logra percibir la división de los conidios en 3 células centrales, y 2 en cada extremo de cada conidio, y contaban con diferentes cantidades de ápices, pero en el otro extremo de los conidios solo presentó una, características similares a las observadas por Morales-Mora et al. (2019), donde indican que los conidios se dividen 3 células centrales y 2 células hialinas en cada extremo del conidio que presentó en uno de los extremos hasta 5 ápices mientras que en el otro extremo solo se presentó una ápice, dichas características son representativas del género *Neopestalotiopsis* sp.

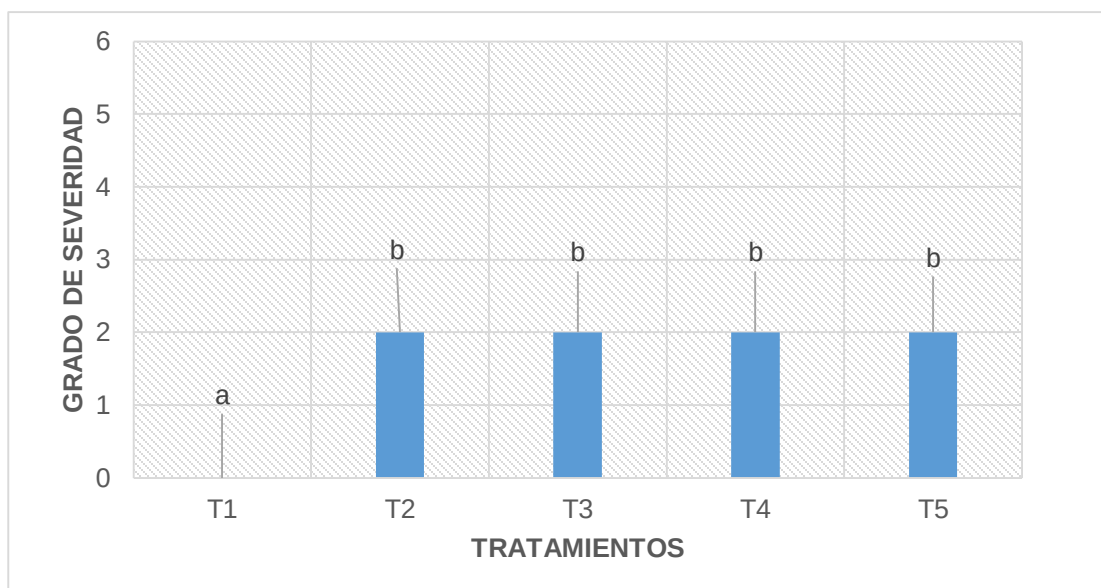
## 4.2 Severidad de la enfermedad en las plantas

### 4.2.1 Severidad 15 días después de la inoculación de la enfermedad.

Al realizar la inoculación de la enfermedad en plantas de fresa de la variedad San Andreas, se observaron diferentes síntomas en los tratamientos y en el testigo enfermo, en cambio el testigo sano no presentó ningún síntoma. Los síntomas observados fueron, clorosis en las hojas y posteriormente se presentaron manchas necróticas concéntricas en las mismas. En los bordes de los nuevos brotes se presentó una necrosis completamente en toda la hoja, esto concuerda con lo obtenido por Sarmiento-Chacón et al. (2023), quienes observaron pequeñas manchas ovaladas necróticas con un punto negro en el centro en plantas de palma camedor (*Chamaedorea quezalteca*) a los cuatro y ocho días después de haber sido inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp. Los síntomas observados durante el experimento también coinciden con lo presentado por Rebollar-Alviter et al. (2020), donde reportaron que las plantas de fresa inoculadas con un aislado de *Neopestalotiopsis* sp. presentaron pequeñas manchas necróticas a los 3 días después de su inoculación, las mismas fueron creciendo gradualmente en patrón concéntrico hasta convertirse en manchas más grandes, así mismo, mencionan que a los 10 días después de la inoculación, los síntomas presentes en el peciolo fueron manchas que se desarrollaron hasta provocar la marchitez de las hojas a causa de un anillamiento en el peciolo. De igual manera Baggio et al. (2021) indican que la marchitez de las hojas fue uno de los principales síntomas que se presentaron en las plantas a los 12 días de ser inoculadas con la enfermedad.



**Figura 4.3-** Síntomas presentados a los 15 días: A) Planta sana, B) Ligeró amarillamiento y C) Manchas necróticas concéntricas en las hojas.



**Figura 4.4-** Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 15 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5).

En la Figura 4.4 se observa que el tratamiento 1 (Testigo sano) presentó diferencia estadísticamente significativa con los otros 4 tratamientos, mientras que el tratamiento 2 (Testigo enfermo), tratamiento 3 (*Trichoderma harzianum*), tratamiento 4 (*Metarhizium anisopliae*) y tratamiento 5 (*Beauveria bassiana*) no presentaron diferencia estadísticamente significativa. Esto indica que el testigo sano no presentó ningún síntoma, mientras que los otros 4 tratamientos presentaron el síntoma de ligero amarillamiento llegando a presentar manchas necróticas concéntricas en las hojas que es el síntoma 2.

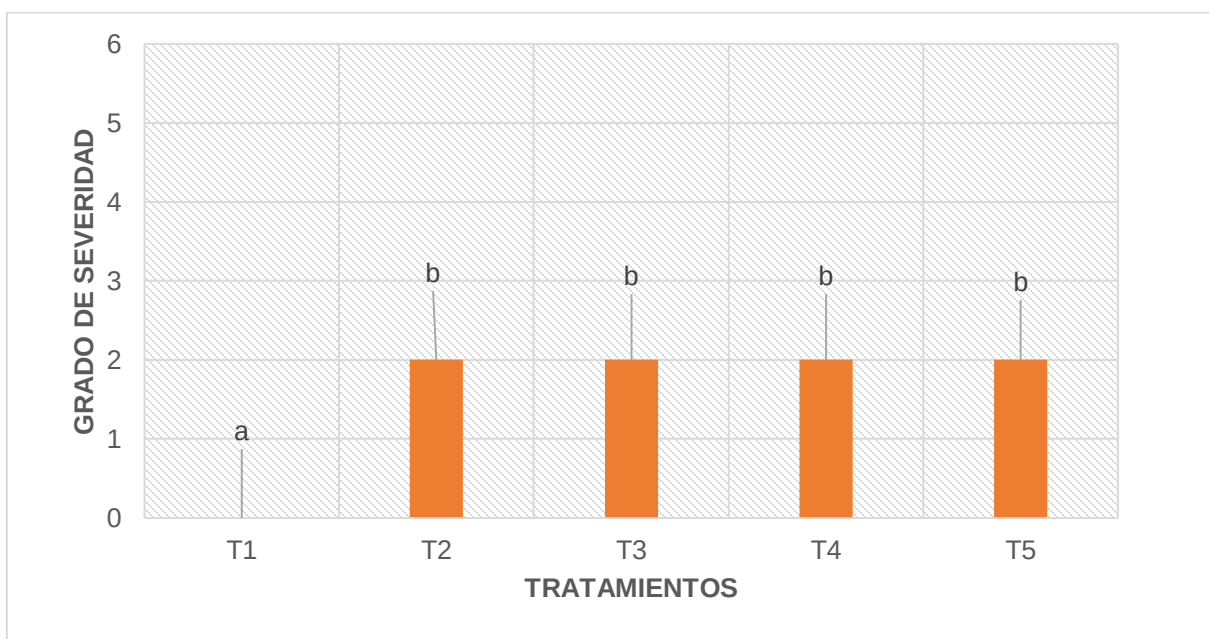
#### 4.2.2 Severidad de plantas 30 días de la inoculación de la enfermedad

De los 16 a los 30 días, de acuerdo a la escala de severidad se presentaron manchas concéntricas circulares en las hojas que se fueron desarrollando y creciendo con el paso del tiempo, estos síntomas se hicieron presentes en el testigo enfermo y en los tratamientos de *Trichoderma harzianum*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Los síntomas observados coinciden con los reportados por Morales-Mora et al. (2019), donde indican que a los 15 días de la inoculación de la enfermedad se presentó una necrosis en las hojas y en el tallo hasta provocar la marchitez de la hoja

junto con el peciolo. Así mismo, Baggio et al. (2021) reportan síntomas de retraso en el crecimiento, marchitamiento y muerte de plantas de fresa a las tres semanas de haber inoculado el patógeno en la planta. Por su parte Rebollar-Alviter et al. (2020) reportan que los síntomas en el peciolo aparecieron a los 20 días después de la inoculación de la enfermedad como pequeñas manchas negras hasta convertirse en lesiones negras hundidas. Mertely et al. (2015) reportaron retraso de crecimiento y la muerte prematura de las hojas más viejas en 16 a 20 plantas inoculadas.



**Figura 4.5-** Síntomas presentados a los 30 días: A) Planta sana, B) Ligeró amarillamiento y C) Manchas necróticas concéntricas en las hojas.



**Figura 4.6-** Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 30 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5).

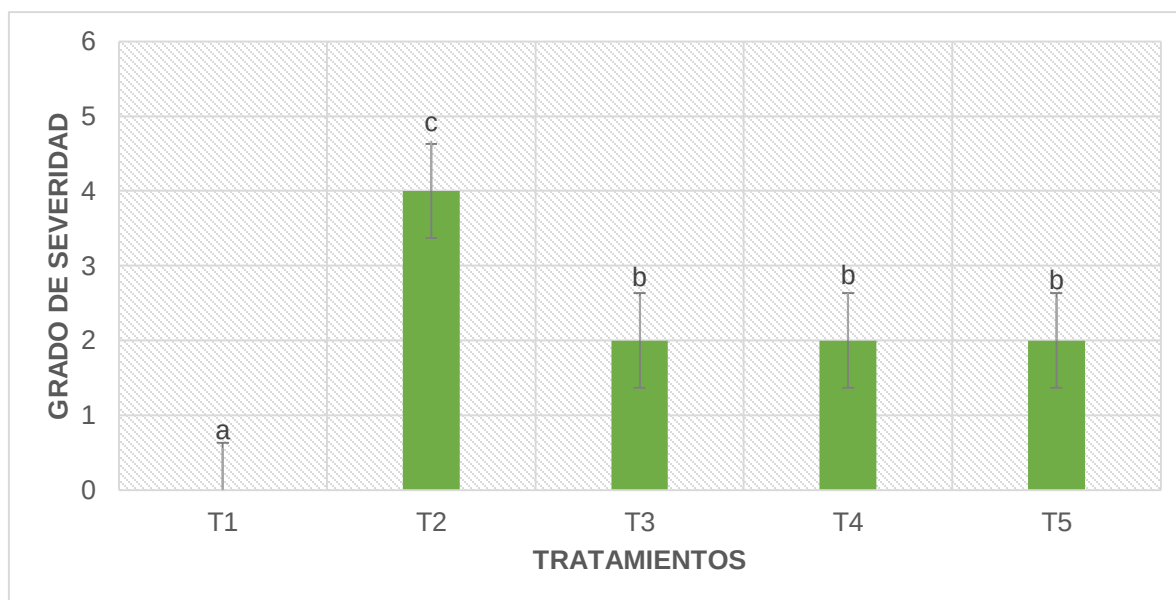
En la Figura 4.6 se observa que el tratamiento 1 (Testigo sano) presentó diferencia estadísticamente significativa con los otros 4 tratamientos, mientras que el resto de los tratamientos los cuales son 2 (Testigo enfermo), tratamiento 3 (*Trichoderma harzianum*), tratamiento 4 (*Metarhizium anisopliae*) y tratamiento 5 (*Beauveria bassiana*) no se presentó una diferencia estadísticamente significativa. Esto indica que el testigo sano no presentó ningún síntoma, mientras que los tratamientos restantes presentaron el síntoma de ligero amarillamiento y manchas necróticas concéntricas en las hojas que es el síntoma 2.

#### 4.2.3 Severidad de plantas a los 45 días después de la inoculación de la enfermedad.

De los 31 a los 45 días, en el testigo enfermo se observaron los siguientes síntomas: planta marchita y las hojas más viejas presentaron una fuerte necrosis. Mientras que en los tratamientos de *T. harzianum*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* solo se presentaron los síntomas de manchas necróticas concéntricas en las hojas. Esto concuerda con los síntomas reportados por Gilardi et al. (2019), donde mencionan que la pudrición de corona en la fresa generalmente termina en el marchitamiento de las plantas, lo cual se comenzó a desarrollar entre los 25 y 48 días después de la inoculación. Machin et al. (2019) señalan que después de las 5 semanas de la inoculación se desarrollaron síntomas como lo son áreas de color oxidado en las hojas, decoloración y necrosis que se extienden a la corona y raíz de la planta, llegando a causar su muerte.



**Figura 4.7-** Síntomas presentados a los 45 días: A) Lesiones en peciolo y B) Hojas viejas necrosadas.



**Figura 4.8-** Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 45 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5).

En la Figura 4.8 se observa que el tratamiento 1 (Testigo sano) presentó diferencia estadísticamente significativa con los otros 4 tratamientos, el tratamiento 2 (Testigo enfermo) presentó diferencia estadísticamente significativa con todos los tratamientos, mientras que el tratamiento 3 (*Trichoderma harzianum*), tratamiento 4 (*Metarhizium anisopliae*) y tratamiento 5 (*Beauveria bassiana*) no se presentó una diferencia estadísticamente significativa. Esto indica que el testigo sano no presentó ningún síntoma, el tratamiento 2 presentó manchas negras en el peciolo y hojas marchitas y en las más viejas una necrosis intensa, y en los tratamientos con hongos benéficos se presentaron hasta los síntomas de manchas necróticas en las hojas.

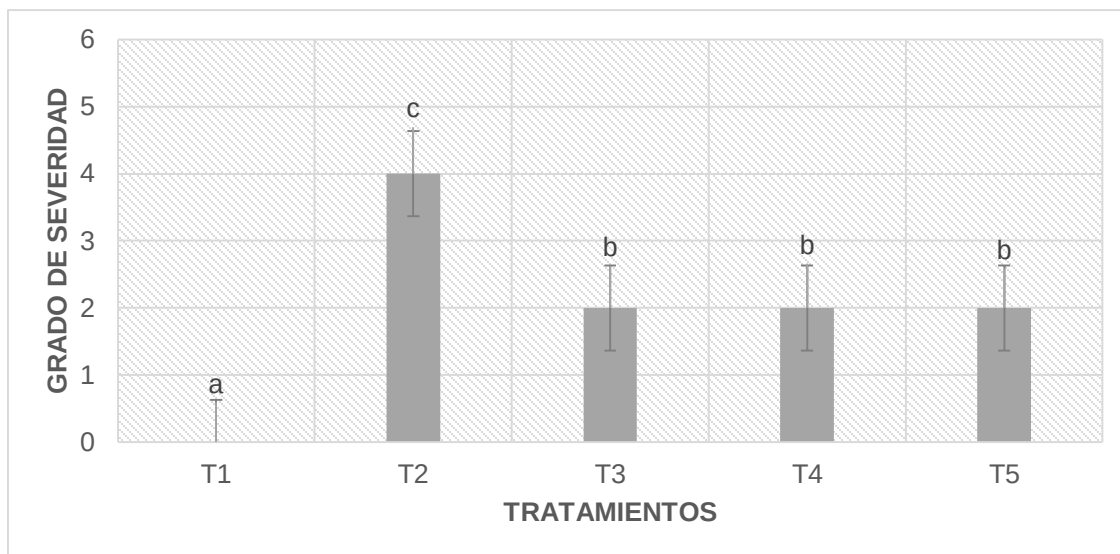
#### 4.2.4 Severidad de plantas a los 60 días después de la inoculación de la enfermedad.

De los 46 a los 60 días después de la inoculación, los síntomas que se presentaron en los testigos enfermos fueron: plantas marchitas y las hojas más viejas de las mismas mostraron una severa necrosis. Mientras que en los tratamientos de *T. harzianum*, *M. anisopliae* y *B. bassiana* se presentaron manchas necróticas concéntricas que aumentaron de tamaño, mientras que el testigo sano no presentó síntoma alguno que

causara algún daño en el desarrollo del cultivo. Esto difiera a lo reportado por Gilardi et al. (2019), quienes de los 43 a los 57 días después de la inoculación obtuvieron entre un 50 a 70% de plantas muertas. La temperatura y humedad relativa promedio registrada fue de 32°C y 41% respectivamente. La temperatura y la humedad relativa pudo haber sido un factor para el desarrollo del patógeno y por ende las plantas no colapsaron, Dung et al. (2016) indican que para que el patógeno se desarrolle requiere de temperaturas promedio de entre 20 a 25°C y una humedad relativa superior al 95%. Los tratamientos evaluados a base de hongos benéficos mostraron un menor grado de severidad a comparación del testigo enfermo, lo cual indica que los hongos benéficos intervinieron para que la enfermedad no se desarrollara completamente, ya que el testigo infectado alcanzó un grado de 4 mientras que los tratamientos con los biocontroladores expresaron solo manchas necróticas correspondientes al número 2 en la escala de daños. Resultados similares a los obtenidos por López et al. (2022) quienes al inocular *B. bassiana* en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas con *Fusarium oxysporum* obtuvieron que este entomopatógeno se comporta como un agente de control biológico de *F. oxysporum*, Picardal et al. (2019) reportan que *M. anisopliae* mostró un nivel aceptable de antagonismo contra *F. oxysporum*, por lo cual se le puede utilizar como controlador biológico alternativo en campo, Ezziyyani et al. (2004) señalan que *T. harzianum* redujo el desarrollo de la podredumbre causada por *Phytophthora capsici* en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum*) debido a su alto grado de inhibición de la enfermedad.



**Figura 4.9-** Síntomas presentados a los 60 días: A) Lesiones en peciolo y B) Hojas viejas necrosadas.



**Figura 4.10-** Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 60 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5).

En la Figura 4.10 se observa que el tratamiento 1 (Testigo sano) presentó diferencia estadísticamente significativa con los otros 4 tratamientos, el tratamiento 2 (Testigo enfermo) presentó diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos, mientras que los tratamientos 3 (*Trichoderma harzianum*), 4 (*Metarhizium anisopliae*) y 5 (*Beauveria bassiana*) no presentaron una diferencia estadísticamente significativa. Esto indica que el testigo sano no presentó ningún síntoma, el tratamiento 2 presentó manchas negras en el peciolo y hojas marchitas y en las más viejas una necrosis intensa, y en los tratamientos con *Trichoderma*, *Metarhizium* y *Beauveria* se presentó el síntoma 2 que fueron manchas necróticas en las hojas.

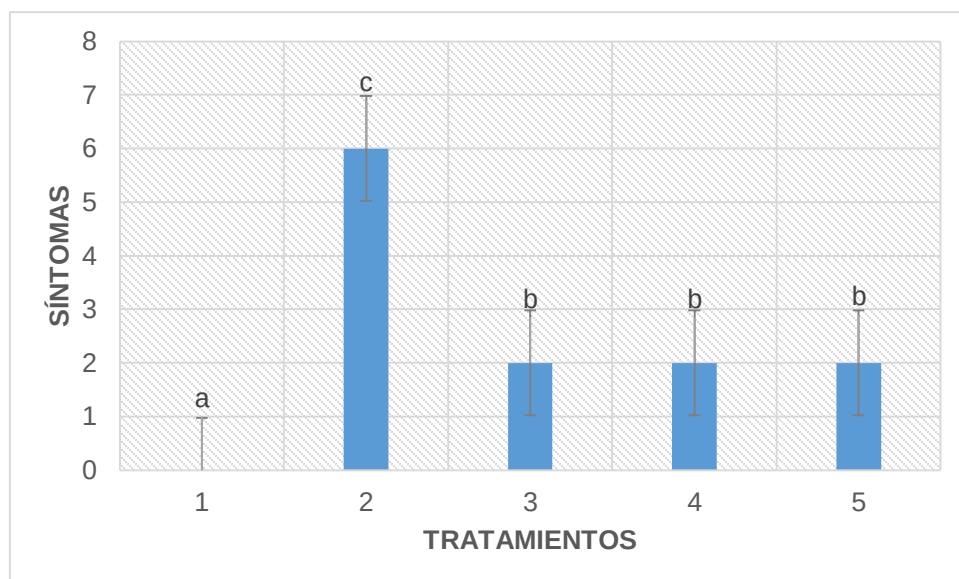
#### 4.2.5 Severidad 75 días después de la inoculación de la enfermedad.

Después de los 61 días de la inoculación de la enfermedad, las plantas del testigo enfermo comenzaron a colapsar. A los 75 días el 100% de las plantas que conformaban este tratamiento estaban completamente muertas. En los tratamientos a base de los hongos benéficos el síntoma que se mantuvo fue el número dos, el cual corresponde en la escala arbitraria a lesiones en forma de anillos concéntricos en las hojas, mientras que las plantas del testigo sano no presentaron ningún síntoma. Con estos resultados se puede verificar que los hongos antagónicos utilizados en la

presente investigación disminuyeron el grado de severidad de *Neopestalotiopsis* sp. en plantas de fresa infectadas. Resultados similares a los reportados por Villamil-Carvajal et al. (2015), donde indican que *Trichoderma* sp. es potencialmente eficiente en el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *T. cacao* en condiciones de campo, al inducir menores porcentajes de severidad externa e interna, un menor progreso de la enfermedad y por ende una mayor disminución de daño en los frutos de cacao. Por otra parte, García-Gutiérrez et al. (2012) reportan una menor incidencia de pudrición de la mazorca en maíz causada por *F. verticillioides*, *Aspergillus* spp. y *P. pinophilum*, esto al aplicar *B. bassiana*, por ende, este hongo antagónico es considerado una buena alternativa para disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad. Así mismo, Guigón-López et al. (2019) obtuvieron que el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* inhibe la germinación de las conidias *Leveillula taurica*, en el cultivo de pimiento de árbol *M. anisopliae* redujo la gravedad de la enfermedad y con ello demostró su eficacia en el control del mildiú polvoroso en los pimientos.



**Figura 4.11-** Síntomas presentados a los 75 días: A) Áreas de color marrón en la corona y B) Planta colapsada.



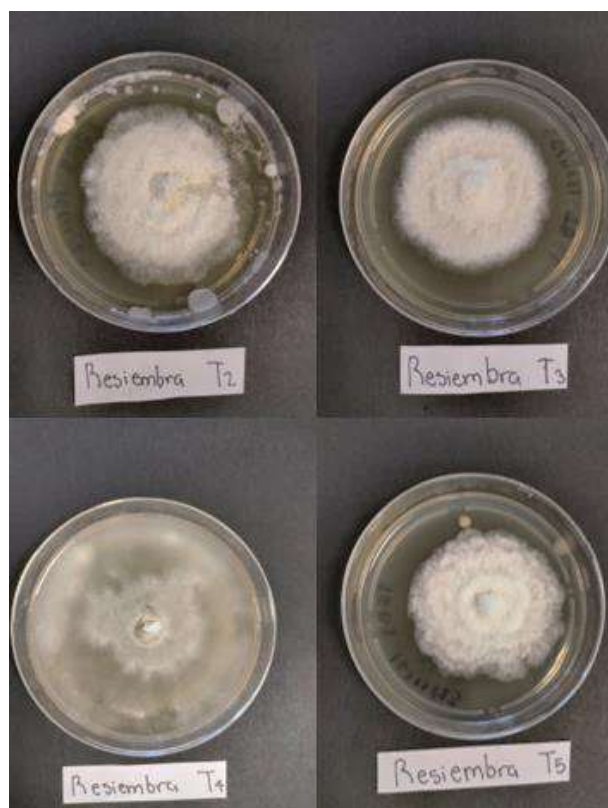
**Figura 4.12-** Grado de severidad de los síntomas que se presentaron a los 75 días después de la inoculación de la enfermedad. Testigo sano (T1), Testigo enfermo (T2), *Trichoderma harzianum* (T3), *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5).

En la Tabla 4.12 se observa que el T1 presentó diferencia estadísticamente significativa con los 4 tratamientos, el T2 presentó diferencia estadísticamente con todos los tratamientos, mientras que T3, T4 y T5 no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre ellos mientras que con los tratamientos 1 y 2 si se presentó una diferencia estadísticamente significativa. T1 no presentó ningún síntoma, T2 se presentaron todos los síntomas de la enfermedad hasta ocasionar la muerte de estas, mientras que T3, T4 y T5 solo se presentaron hasta el síntoma 2 que son manchas necróticas concéntricas en las hojas.

### 4.3 Pruebas con los postulados de Koch

Se tomó una planta por tratamiento que presentará los síntomas característicos de la enfermedad, el aislamiento de la enfermedad se realizó en base a la metodología propuesta por Agrios (2005), para comprobar si el patógeno inoculado es el causante de la marchitez y pudrición de corona en las plantas de fresa. Al realizar el aislamiento se obtuvo que el patógeno causante de marchitez de las plantas de fresa es *Neopestalotiopsis* sp. Lo elaborado se relaciona con lo indicado por Van Hemelrijck et al. (2017) quienes mencionan que una vez que las plantas hayan muerto se volvió a

aislar para confirmar que la muerte de estas fue a causa de *Neopestalotiopsis* sp., mientras que Chamorro et al. (2016) reportan al hongo *Neopestalotiopsis clavispora* como el causante de la pudrición de la corona y raíz en las plantas de fresa.



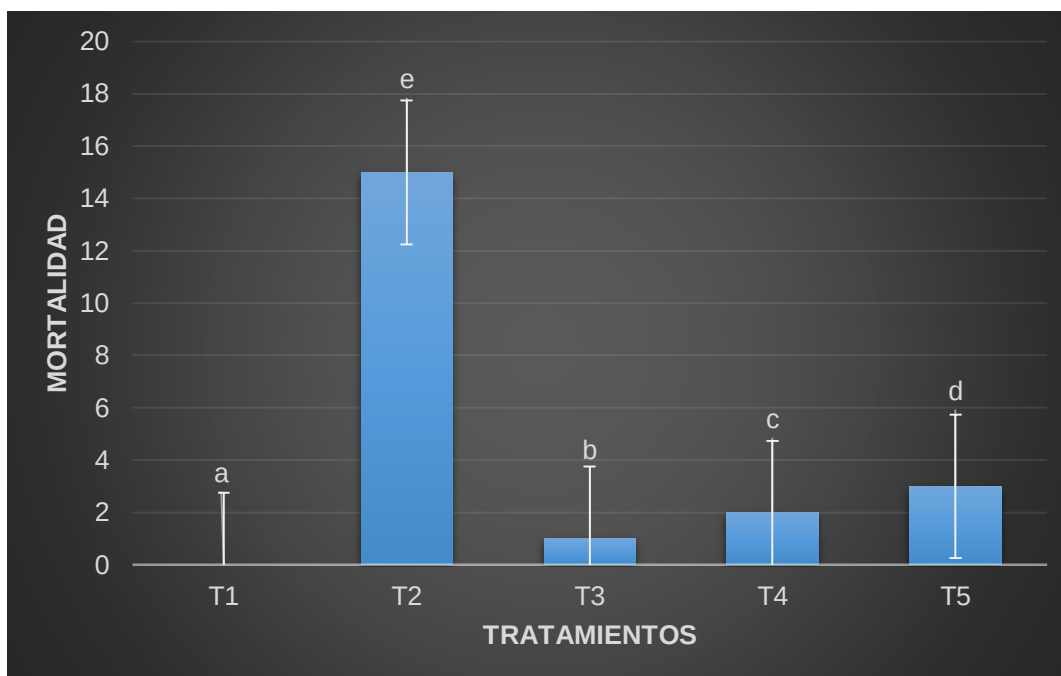
**Figura 4.13-** *Neopestalotiopsis* sp. reislado de material vegetal infectado.

## 4.4 Mortalidad de plantas

A los 75 días después de la inoculación del patógeno en las plantas, colapsaron el 100% de los ejemplares que conformaban el tratamiento control enfermo. Los resultados difieren a los obtenidos por Van Hemelrijck et al. (2017), quienes obtuvieron una mortalidad del 80 a un 100% a las 8 semanas después de inocular la enfermedad en las plantas, esto en condiciones de temperaturas promedio de 20°C, mientras que Gilardi et al. (2019) mencionan que las plantas de fresa presentaron una mortalidad de 50 a 70% después de los 43 a 57 días de la inoculación de la enfermedad. Los resultados en la mortandad de las plantas enfermas sin ningún tratamiento control se

pudo haber extendido debido a que durante la investigación se tomaron mediciones de temperatura de hasta 39.5°C y humedades relativas bajas de hasta 35%, Dung et al. (2016) señalan que para que el patógeno (*Neopestalotiopsis* spp.) se desarrolle requiere condiciones de 20 a 25°C en cuestión de temperatura y una humedad relativa que va desde un 95% a 100%. Chamorro et al. (2016) indican una mortalidad de plantas inoculadas con el patógeno de 7.4, 7.4 y 11.1% para las variedades de fresa: Florida radiance, Splendor y Sabrina respectivamente, las cuales son más susceptibles a la enfermedad en comparación con la variedad evaluada en la presente investigación (San Andreas). Alrededor de 23.4% y 25.9%, de las plantas inoculadas mostraron más del 75% de pudrición de corona y de la raíz.

Por otra parte, el tratamiento que mostró mayor número de plantas muertas fue *Beauveria bassiana* con un total de 3 plantas muertas seguido de *Metarhizium anisopliae* con 2 y por último *Trichoderma harzianum* con 1 planta muerta. En base a esto se puede confirmar que los tratamientos utilizados en esta investigación a base de hongos benéficos exhibieron efectividad para el control de la enfermedad. Resultados similares a los reportados por Miguel-Ferrer et al. (2021), quienes obtuvieron que *T. harzianum* disminuyó el porcentaje de mortalidad por marchitez y pudrición de la raíz en plantas de chile Miahuateco bajo infección inducida con *Fusarium solani*. Así mismo, Pérez-Torres et al. (2018) señalan que el hongo antagonico *T. harzianum* logró reducir las afectaciones de *Pyricularia grisea* Sacc en el cultivo de arroz, por lo que consideran la aplicación de este hongo como alternativa biológica de control.



**Figura 4.14-** Mortalidad de plantas por tratamiento.

Se realizó una prueba de Tukey HSD a un nivel de confianza del 95%. En la Figura 4.8 se muestra la mortalidad que presentaron las plantas de fresa en campo. El tratamiento evaluado a base de *T. harzianum* (T3) fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos, al igual que el tratamiento a base de *Metarhizium anisopliae* (T4) y *Beauveria bassiana* (T5) que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos y al resto de los tratamientos. El tratamiento donde más plantas sobrevivieron fue *T. harzianum* con solo una planta muerta y el menos efectivo *B. bassiana* con tres plantas colapsadas. El testigo enfermo (T2) y testigo sano (T1) exhiben una diferencia estadísticamente significativa con el resto de los tratamientos.

## **V. CONCLUSIÓN**

Se logró realizar la identificación de *Neopestalotiopsis* sp. a partir de ejemplares enfermos con la sintomatología característica de la enfermedad. Para corroborar que efectivamente se trataba de este patógeno se realizaron ensayos con los postulados de Koch, se obtuvo que *Neopestalotiopsis* sp. fue el causante de la pudrición de la corona y mancha foliar en plantas de fresa. A los 75 días después de la inoculación de la enfermedad, los tratamientos a base de hongos benéficos no mostraron diferencia estadísticamente significativa en el grado de severidad entre ellos, sin embargo, presentan diferencia significativa entre el testigo sano y el enfermo. Con base en esto se concluye que el uso de controladores biológicos genera una reducción en la sintomatología causada por *Neopestalotiopsis* sp. en ejemplares de fresa enfermos. Con tres aplicaciones de cada tratamiento, *Neopestalotiopsis* sp. no causó una mortalidad significativa en las plantas de fresa inoculadas con los hongos de control. En el T3 (*Trichoderma harzianum*) las plantas muertas fueron 1 de 15, mientras que, en el T4 (*Metarhizium anisopliae*) fueron un total de 2 plantas colapsadas de 15. Por otra parte, en el tratamiento T5 (*Beauveria bassiana*) murieron 3 de las 15 plantas totales evaluadas. Con esto se finaliza que el tratamiento a base de *T. harzianum* disminuyó el número de plantas muertas a comparación con el testigo enfermo.

## **VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Acuña-Caita, J.F. y Fischer, G. (2020). *Fresa (Fragaria × ananassa Duch.): Manual de recomendaciones técnicas para su cultivo en el departamento de Cundinamarca*. Bogotá, D. C.: Corredor Tecnológico Agroindustrial CTA-2. [http://investigacion.bogota.unal.edu.co/fileadmin/recursos/direcciones/investigacion\\_bogota/Manuales/04-manual-fresa-2020-EBOOK.pdf](http://investigacion.bogota.unal.edu.co/fileadmin/recursos/direcciones/investigacion_bogota/Manuales/04-manual-fresa-2020-EBOOK.pdf)

Acuña-Jiménez, M., García-Gutiérrez, C., Rosas-García, N.M., López-Meyer, M. y Saíenz- Hernández, J.C. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (METSCHNIKOFF) sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (FABRICIUS). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 31(3), 219-226.

Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.

Ángel-García, C., Robledo-Buriticá, J. y Castaño-Zapata, J. (2018). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium solani* f. sp. *Passiflorae*, en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* (1), 23-31.

Ávila, E. (2015). *Manual Fresa*. Cámara de Comercio de Bogotá. <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14312/Fresa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Azad-Aziz, B. & Abdulla-Marzani, Q. (2017). Molecular identification and management of *Rhizoctonia fragariae* the pathogen of black root rot of strawberry plant. *Science Journal of University of Zakho*, 5(2), 172-177.

- Baggio, J., Forcelini, B., Wang, N., Ruschle, R., Mertely, J. & Peres, N. (2021). Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant disease*, 105(2), 305-315.
- Barquero, J., Meneses, R., Barrantes, L., Ugalde, P., Villalobos, N. y Serrano, D. (2007). *Agrocadena de fresa*. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9555.pdf>
- Barrera, J.J. y Echenique, D.K. (2019). Efecto de crecimiento de hongos antagonistas (*Trichoderma* sp y *Gliocladium* sp) frente a hongos entomopatógenos (*Metarhizium* sp, *Paecilomyces* sp y *Beauveria* sp) en medio nutritivo de PDA. [Tesis de Ingeniería, Universidad de los llanos]. Repositorio Universidad de los llanos.
- Bianchi, P.G. (2018). *Guía completa del cultivo de las fresas*. Editorial De Vecchi, S.A.
- Bolda, M. (2011). Aparece marchitez de *Verticillium* en campos de fresa en Watsonville-Salinas. *ARN Blogs*. <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=5296>
- Bonilla, C.R., Villamil, J.A., Reyes, P. (2011). *Cartillas del Corredor Cultivando su futuro Fresa (Fragaria x ananassa Duch)*. EPE Medios Ltda.
- Borges, D., Díaz, A.O., San Juan, A.N. y Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 44(3), 49-55. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120684008>

- Borrero, C., Castaño, R. & Avilés, M. (2018). First Report of *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) Causing Canker and Twig Dieback on Blueberry Bushes in Spain. *Plant Disease*, 102(6), 1066-1071.
- Cano, M.A. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 263-276.
- Carballo, M. y Guharay, F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas (1ed), Managua: CATIE (232 p). Serie técnica. Manual técnico/CATIE; N° 53. [https://www.ciaorganico.net/documypublic/525\\_CONTROL\\_BIOLOGICO\\_DE\\_PLAGAS\\_AGRICOLAS.pdf](https://www.ciaorganico.net/documypublic/525_CONTROL_BIOLOGICO_DE_PLAGAS_AGRICOLAS.pdf)
- Chamorro, M., Aguado, A. & De los Santos, B. (2016). First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Disease*. [https://www.researchgate.net/profile/ManuelChamorro2/publication/291370890\\_First\\_Report\\_of\\_Root\\_and\\_Crown\\_Rot\\_Caused\\_by\\_Pestalotiopsis\\_clavispora\\_Neopestalotiopsis\\_clavispora\\_on\\_Strawberry\\_in\\_Spain/links/56e9524c08aedfed73898844/First-Report-of-Root-and-Crown-Rot-Caused-by-Pestalotiopsis-clavispora-Neopestalotiopsis-clavispora-on-Strawberry-in-Spain.pdf](https://www.researchgate.net/profile/ManuelChamorro2/publication/291370890_First_Report_of_Root_and_Crown_Rot_Caused_by_Pestalotiopsis_clavispora_Neopestalotiopsis_clavispora_on_Strawberry_in_Spain/links/56e9524c08aedfed73898844/First-Report-of-Root-and-Crown-Rot-Caused-by-Pestalotiopsis-clavispora-Neopestalotiopsis-clavispora-on-Strawberry-in-Spain.pdf)
- Chiriboga, H., Gómez, G. y Garcés, K. (2015). *Trichoderma* spp. para el control biológico de enfermedades. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*.

- Chiriboga, H., Gómez, G. y Garcés, K. (2015). *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*.
- Dung, L., Thi-Dien, N., Hoang-Dai, P. & Ngoc-Tuan, P. (2016). The first report of *Pestalotiopsis* sp. causing crown rot disease on strawberries in Dalat. *Dalat University Journal of Science*, 6(3), 364-376.  
[https://doi.org/10.37569/DalatUniversity.6.3.81\(2016\)](https://doi.org/10.37569/DalatUniversity.6.3.81(2016))
- Elad Y., Chet, I., Boyle, P. & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*—Scanning Electron Microscopy and Fluorescence Microscopy. *Phytopathology*, 73, 85-88.  
[https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n01\\_85.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n01_85.PDF)
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Sid-Ahmed, A., Requena, M.E. y Candela, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Revista Anales de Biología*, 26, 35-45.  
<https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>
- Figuerola, C.R., Concha, C.M., Figuerola, N.A. y Tapia, G. (2018). *Frutilla Chilena*. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca.
- Flórez, M., López, J. y Valencia, A. (2005). Actividad de  $\alpha$ -amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 123-126.

Fuentes-Castillo, C. (2007). LOS POSTULADOS DE KOCH: REVISIÓN HISTÓRICA Y PERSPECTIVA. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 262-266.

García-García, M.A., Cappello-García, S., Lesher- Gordillo, J.M. y Molina-Martínez, R.F. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte sanitario*, 10(2), 21-28.

García-Gutiérrez, C., Lizárraga-Sánchez, G.J., Armenta-Bojórquez, D.A. y Apodaca-Sánchez, M.A. (2012). Efecto de productos biorracionales en la incidencia de hongos y concentración de aflatoxinas en maíz blanco cultivado en Sinaloa, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12 (4), 830-838.  
<https://www.bioline.org.br/pdf?cg12094>

Gilardi, G., Bergeretti, F., Gullino, M.L. & Garibaldi, A. (2019). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry in Italy. *Plant disease*, 103(11), 2959. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0673-PDN>

Google Earth. (2023). Instituto Tecnológico Superior de Abasolo.

Guigón-López, C., Muñoz-Castellanos, L.N. & Flores-Ortiz, N.A. (2019). Control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) using *Trichoderma asperellum* and *Metarhizium anisopliae* in different pepper types. *BioControl*, 64, 77–89.  
<https://doi.org/10.1007/s10526-018-09916-y>

Gutiérrez-Cano, A.A. (2002). *El cultivo de la fresa en el oriente antioqueño*.  
<http://hdl.handle.net/20.500.12324/17659>

- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species —opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 2, 43–56.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Hajek, A.E. & Leger, R.S. (2003). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39(1), 293-322.  
[https://www.researchgate.net/publication/234150171\\_Interactions\\_Between\\_Fungal\\_Pathogens\\_and\\_Insect\\_Hosts](https://www.researchgate.net/publication/234150171_Interactions_Between_Fungal_Pathogens_and_Insect_Hosts)
- Henry, P.M., Pincot, D., Jenner, B.N., Borrero, C., Avilés, M., Nam, M., Epstein, L., Knapp, S.J. & Gordon, T.R. (2021). Horizontal chromosome transfer and independent evolution drive diversification in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *New Phytologist*, 230 (1), 327–340.  
<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.17141>
- Iribarren, M.J., González, B.A. y Filippini, S. (2012). Distribución de *Phytophthora cactorum* en el perfil de un suelo cultivado con frutilla (*Fragaria x ananassa*). *Summa Phytopathology*, 38(1), 17-23.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010). Compendio de información geográfica municipal 2010 Abasolo, Guanajuato. México: INEGI.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.

- INTAGRI (Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura). (2022). *Neopestalotiopsis* sp. en Fresa. *Serie Fitosanidad*, (138), 1-3. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/neopestalotiopsis-sp-en-fresa>
- INTAGRI. (2016). *Beauveria bassiana* en el control biológico de patógenos. *Serie Fitosanidad*, (38). 1-4. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>
- Jayawardena, R.S., Liu, M., Maharachchikumbura, S.S., Zhang, W., Xing, Q., Hyde, K.D. & Yan, J. (2016). *Neopestalotiopsis vitis* sp. nov. causing grapevine leaf spot in China. *Phytotaxa*, 258(1), 63-74.
- Joublan, J.P. y Vergara, M. (2002). Desarrollo vegetativo y productivo de la frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.), utilizando una cubierta de agrotexil de diferentes densidades. *Agro Sur*, 31(1), 37–47. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2003.v31n1-05>
- Khachatourians, G. & Qazi, S. (2008). Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology. En A. A. Brakhage y P.F. Zipfel (Eds). *Human and animal relationships* (pp. 33-61). Springer Berlin Heidelberg.
- Koike, S. y Bolda, M. (2013). Marchitez de *Fusarium* en fresa: un segundo patógeno del suelo en California. *ARN Blogs*. <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=11131>
- Kuhar, F., Castiglia, V. y Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Revista boletín biológica*, (28), 11-18.

Loeza, G. (2018). *Manual de Producción de fresa en Coalcomán Michoacán*. Instituto Tecnológico Superior de Coalcomán.  
<https://www.itscoalcoman.edu.mx/content/descargas/vinculacion/MANUAL%20PARA%20CULTIVO%20DE%20FRESA%20EN%20COALCOMAN.pdf>

López-Herrera, C. y Melero-Vara, J.M. (2020). Control de enfermedades causadas por hongos y oomicetos en cultivos agrícolas. *Protección de Cultivos*, (5), 20-27.  
<http://sef.es/sites/default/files/publications/fitopatologiaSEFn5.pdf>

López-López, H., Ruiz-Lau, N., Meza-Gordillo, R., Ruiz-Valdiviezo, V.M., Robledo-Luchetti, J.G., Lecona-Guzmán, C.A., Villalobos-Maldonado, J.J., Dendooven, L. & Montes-Molina, J.A. (2022). Antifungal Potential of *Beauveria bassiana* on *Solanum lycopersicum* L. Infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 92(4), 1235-1255.  
<https://doi.org/10.32604/phyton.2023.025716>

Machín, A., González, P., Vicente, E., Sánchez, M., Estelda, C., Ghelfi, J. & Silvera-Pérez, E. (2019). First report of root and Crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on Strawberry in Uruguay. *Plant disease*, 103(11), 2946-2946.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN>

Marina, A. (2018). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. *AGROSAVIA*, 1, 42-52.

Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.

- Martínez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H. y Cruz, A. (2008). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista Protección Vegetal*, 23(2), 118-125.
- Mertely, J., Chamorro, M. & Peres, N.A. (2015). *Pestalotiopsis* spp., a newly discovered root pathogen of strawberry transplants. *Phytopathology*, 105, 525-525. [https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015\\_meeting\\_abstracts/aps2015abP607.htm](https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abP607.htm)
- Miguel-Ferrer, L., Romero-Arenas, O., Andrade-Hoyos, P., Sánchez-Morales, P., Rivera-Tapia, J.A. y Fernández-Pavía, S.P. (2021). Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(2), 228-247. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2101-5>
- Morales, C.M., Riquelme, J., Hirzel, J., France, A., Pedreros, A., Uribe, H. y Abarca, P. (2017). *Manual de manejo agronómico de la frutilla* (Instituto de Investigaciones Agropecuarias, N°382). [https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6713/Bolet%C3%ADn%20INIA%20N%C2%B0%20382?sequence=1&isAllowed=](https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6713/Bolet%C3%ADn%20INIA%20N%C2%B0%20382?sequence=1&isAllowed=1)
- Morales-Mora, L. A., Martínez-Salgado, S. J., Valencia de Ita, M. A., Andrade-Hoyos, P., Silva-Rojas, H. V. & Romero-Arenas, O. (2019). First report of leaf spot and anthracnosis caused by *Pestalotiopsis* sp., on strawberry in Puebla, Mexico. *Plant disease*, 103(10), 2668.
- Moreno-Velandia, C.A., Cotes, A.M., Beltrán-Acosta, C., Bettiol, W. y Elad, Y. (2018). Control biológico de fitopatógenos del suelo. En A. M. Cotes (Ed.), *Control biológico*

*de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 144-221). AGROSAVIA.

National Center of Biotechnology Information. (2023). *Taxonomy of Beauveria bassiana*. National Center of Biotechnology Information.

National Center of Biotechnology Information. (2023). *Taxonomy of Trichoderma harzianum*. National Center of Biotechnology Information.

Nega, A. (2014). Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(27), 33-54.

Obregón, V.G., Ibañez, J.M. y Lattar, T.E. (2020). Guía para la identificación de las enfermedades de la frutilla. *Ediciones INTA*, Estación Experimental Agropecuaria Bella Vista.

Obregón, V.G., Meneguzzi, N.G., Ibañez, J.M., Lattar, T.E. & Kirschbaum, D.S. (2018). First Report of *Neopestalotiopsis clavispora* Causing Root and Crown Rot on Strawberry Plants in Argentina. *Plant disease*, 102(9), 1856-1856. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN>

Olivera-Soto, J. (2012). *Cultivo de Fresa (Fragaria x ananassa Duch.)*. Editorial INIA. Estación Experimental Agraria Donoso – Huaral. [http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/752/1/Olivera-Cultivo\\_de\\_Fresa.pdf](http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/752/1/Olivera-Cultivo_de_Fresa.pdf)

- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E., Gwinn, K. D., Moulton, J. K., & Pereira, R. M. (2008). *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 267-270. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.010>
- Paredes, M., Nolasco, O., Acuña, R. y Gutiérrez, A. (2016). Expresión de genes quitinasas de *Beauveria bassiana* frente a sustratos de *Fusarium oxysporum* y *Peronospora variabilis*. *Scientia Agropecuaria*, 7 (3) 239 – 244.
- Pérez-Jiménez, R.M., Segundo, E. y Talavera, M. (2007). Enfermedades de la fresa causadas por patógenos del suelo. *Agrícola Vergel*, 42-53.
- Pérez-Torres, E., Bernal-Cabrera, A., Milanés-Virelles, P., Sierra-Reyes, Y., Leiva-Mora, M., Marín-Guerra, S. y Monteagudo-Hernández, O. (2018). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro*, 30(1), 17-26. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612018000100002&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100002&lng=es&tlng=es)
- Perniola, O. S., Staltari, S., Chorzempa, S. y Molina, M. C. (2012). Biofumigación con Brassicáceas: actividad supresora sobre *Fusarium graminearum*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 111 (1), 48-53. <http://revista-vieja.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/71>
- Peteira, B., González, I., Arias, Y., Fernández, A., Miranda, I. y Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin. *Revista de protección vegetal*, 26(1), 16-22.

- Picardal, J.P., Tundag, E.D., Picardal, M.T. & Goc-ong, G.B. (2019). Antagonistic Activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Against Phytopathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Schlecht.) as a Biological Control. *CNU Journal of Higher Education* Volume 13,25-33.
- Ramírez, J. y Ayala, M. (2014). Enzimas ¿Qué son y cómo funcionan?. *Revista digital Universitaria*, 15(12), 1-13.
- Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H.V., Fuentes-Aragón, D., Acosta-González, U., Martínez-Ruiz, M. & 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 disease*, 104(4), 2044-2296. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC>
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R. & Collado, I.G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem Rev*, 7, 89-123.
- Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2018). *Manual de medios de cultivo*. BioCen. <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Romero-Arenas, O., Huerta-Lara, M., Damián-Huato, M.A., Domínguez-Hernández, F. y Arellano-Victoria, D.A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.
- Rubio-Susan, V. y Fereres-Castiel, A. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades en los cultivos. En Marín, I., Sanz, J.L. y Amils R. (Eds.), *Biotecnología y medio ambiente* (pp. 215-229). Ephemera.

Santos, B.M. y Obregón, H.A. (2012). Prácticas Culturales para la Producción Comercial de Fresas en Florida. *University of Florida*, 1-2. <https://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/77/37/00001/HS116000.pdf>

Santoyo, J.A. y Martinez, C.O. (2011). *Paquete tecnológico para la producción de fresa*. <https://www.fps.org.mx/portal/index.php/publicaciones/100-frutales/1092-paquete-tecnologico-para-la-produccion-de-fresa>

Sarmiento-Chacón, M., Hernández-García, V., Rodríguez-Larramendi, L.A. & Salas-Marina, M.A. (2023). *Neopestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum karstii*, causal agents of leaf spots on camedor palm (*Chamaedorea quezalteca*) in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 41(2), 165-181. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-7>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2017). *Planeación agrícola nacional 2017-2030. Fresa*. SAGARPA

Sekmen-Cetinel, A.H., Gokce, A., Erdik, E., Cetinel, B. & Cetinkaya, N. (2021). The Effect of *Trichoderma citrinoviride* Treatment under Salinity Combined to *Rhizoctonia solani* Infection in Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Agronomy*, 11(8), 1589. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081589>

SENASICA. (2022). *Monitor fitosanitario*. SENASICA.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2021). Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera,

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México.  
<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Sivila, N., y Álvarez, S. (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. *Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar*. Ed. Universidad Nacional de Jujuy. Jujuy.

Soriano, E., Salgado-Miranda, C., Suárez-Güemes, F. y Trigo, F. (2006). Patogenia microbiana: Conceptos básicos en la interacción hospedero-microorganismo. *Vet. Méx.*, 37(4), 457-465.

Trapero, A. (2011). Los métodos de control de enfermedades: presente y futuro. *PHYTOMA*, 1(233), 71-73.

Valle-Ramírez, S., Torres-Gutiérrez, R., Caicedo-Quinde, W., Abril-Saltos, R. y Sucoshañay-Villalba, D. (2021). Aislamiento y caracterización de *Metarhizium* spp. de cultivos de caña de azúcar y su patogenicidad contra *Mahanarva andigena* (Hemiptera: Cercopidae). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(1), 1-3.

Van Hemelrijck, W., Ceustermans, A., Van Campenhout, J., Lieten, P. & Bylemans, D. (2017). Crown rot in strawberry caused by *Pestalotiopsis*. *Acta Horticulturae*, 1156, 781-786. 10.17660/ActaHortic.2017.1156.115

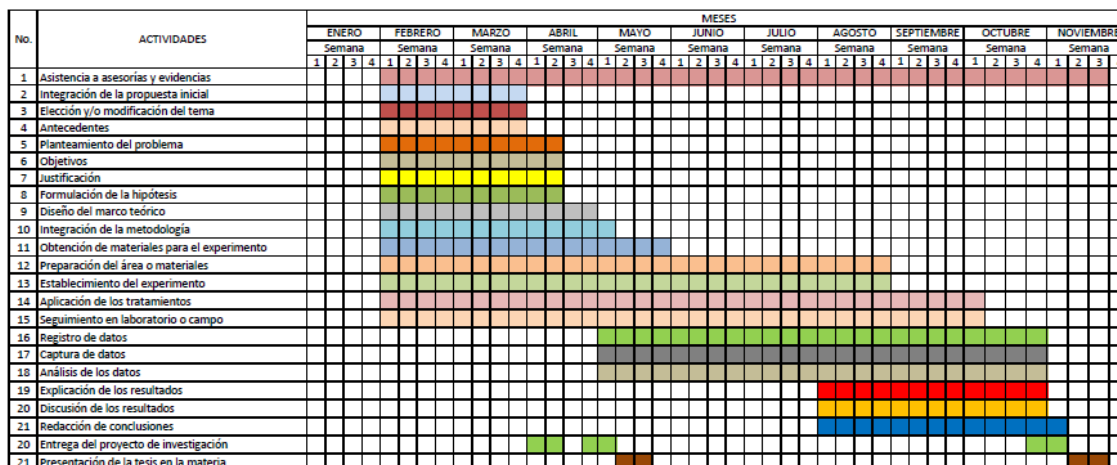
Verma, M., Brar, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. & Valéro, J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37, 1-20.

- Vero, S.M. y Mondino, P. (1999). Control biológico postcosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*, 7, 29-36.
- Villamil-Carvajal, J.E., Viteri-Rosero, S.E. y Villegas-Orozco, W.L. (2015). Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 68(1), 7441-7450.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179933010005>
- Vinchira-Villarraga, D.M. y Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5.
- Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol*, 65(3), 1061-1070.  
<https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1061-1070.1999>

## **VII. ANEXOS**

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

**OBJETIVO GENERAL:** Evaluar la efectividad de hongos benéficos para el control biológico de *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo de fresa.



A continuación, se observan las tablas de ANOVA.

| Fuente              | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                   |    |                |         |         |
| A:TRATAMIENTOS      | 6.4               | 4  | 1.6            | *****   | 0.0000  |
| B:BLOQUE            | 0                 | 1  | 0              | -1.00   | 1.0000  |
| RESIDUOS            | 0                 | 4  | 0              |         |         |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 6.4               | 9  |                |         |         |

**Tabla 7.2-** Tabla ANOVA de los resultados, 30 días después de la inoculación.

| <i>Fuente</i>       | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                          |           |                       |                |                |
| A:TRATAMIENTOS      | 6.4                      | 4         | 1.6                   | *****          | 0.0000         |
| B:BLOQUE            | 0                        | 1         | 0                     | -1.00          | 1.0000         |
| RESIDUOS            | 0                        | 4         | 0                     |                |                |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 6.4                      | 9         |                       |                |                |

**Tabla 7.3-** Tabla ANOVA de los resultados, 45 días después de la inoculación.

| <i>Fuente</i>       | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                          |           |                       |                |                |
| A:TRATAMIENTOS      | 16.0                     | 4         | 4.0                   |                |                |
| B:BLOQUE            | 0                        | 1         | 0                     |                |                |
| RESIDUOS            | 0                        | 4         | 0                     |                |                |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 16.0                     | 9         |                       |                |                |

**Tabla 7.4-** Tabla ANOVA de los resultados, 60 días después de la inoculación.

| <i>Fuente</i>       | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                          |           |                       |                |                |
| A:TRATAMIENTOS      | 16.0                     | 4         | 4.0                   |                |                |
| B:BLOQUE            | 0                        | 1         | 0                     |                |                |
| RESIDUOS            | 0                        | 4         | 0                     |                |                |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 16.0                     | 9         |                       |                |                |

**Tabla 7.5-** Tabla ANOVA de los resultados, 75 días después de la inoculación.

| <i>Fuente</i>       | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                          |           |                       |                |                |
| A: TRATAMIENTOS     | 38.4                     | 4         | 9.6                   | *****          | 0.0000         |
| B: BLOQUE           | 0                        | 1         | 0                     | -0.56          | 1.0000         |
| RESIDUOS            | 0                        | 4         | 0                     |                |                |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 38.4                     | 9         |                       |                |                |

**Tabla 7.6-** Tabla ANOVA de los resultados, de la mortalidad de las plantas.

| <i>Fuente</i>       | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES |                          |           |                       |                |                |
| A: TRATAMIENTOS     | 301.6                    | 4         | 75.4                  | *****          | 0.0000         |
| B: BLOQUE           | 0                        | 1         | 0                     | 2.00           | 0.2302         |
| RESIDUOS            | 0                        | 4         | 0                     |                |                |
| TOTAL (CORREGIDO)   | 301.6                    | 9         |                       |                |                |

En el desarrollo del proyecto se adquirieron diferentes materiales para su establecimiento y realización los cuales se presentan en la Tabla 7.7.

**Tabla 7.7-** Materiales requeridos para el desarrollo del proyecto.

| Material              | Cantidad | Costo unitario | Total                        |
|-----------------------|----------|----------------|------------------------------|
| Macetas               | 75 pza   | 3              | 225                          |
| Extracto de Neem      | 1 L      | 450            | 450                          |
| Piretrinas            | 1 L      | 400            | 400                          |
| Fertilizantes         | 1 Kg     | 200            | 200                          |
| PDA                   | 1 lote   | 2,400          | 2,400                        |
| Cajas petri           | 80 pza   | 5              | 400                          |
| Invernadero           | 1        | 1,500          | 1,500                        |
| Mochila aspersora     | 1        | 700            | 700                          |
| Peróxido de hidrogeno | 1 L      | 150            | 150                          |
| Extracto de pino      | 1 L      | 400            | 400                          |
| Cloro                 | 1 L      | 20             | 20                           |
| Aluminio              | 1 pza    | 20             | 20                           |
| Alcohol               | 2 L      | 75             | 150                          |
| Encendedor            | 1 pza    | 20             | 20                           |
| Gasas                 | 3 cajas  | 15             | 45                           |
| Algodón               | 1 pza    | 45             | 45                           |
| Mango de bisturí      | 1 pza    | 110            | 110                          |
| Pinzas                | 1 pza    | 144            | 144                          |
| Guantes               | 1 caja   | 239            | 239                          |
| Jeringa               | 1 caja   | 50             | 50                           |
| Film estirable        | 1 pza    | 230            | 230                          |
| Previcurp             | 1 pza    | 350            | 350                          |
| Navaja de bisturí     | 1 caja   | 4.2            | 420                          |
| <b>Subtotal=</b>      |          |                | <b>8,668 pesos mexicanos</b> |

**Tabla 7.8-** Datos obtenidos en el bloque 1.

| No. de bloque: 1 |                    |                  |                                 |    |    |    |    |                                    |    |    |    |    |                                                   |    |    |    |    |                                                    |    |    |    |    |                                                |    |    |    |    |
|------------------|--------------------|------------------|---------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------|----|----|----|----|---------------------------------------------------|----|----|----|----|----------------------------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------------------|----|----|----|----|
| Fecha            | % Humedad relativa | Temperatura (°C) | Tratamiento 1<br>(Testigo sano) |    |    |    |    | Tratamiento 2<br>(Testigo enfermo) |    |    |    |    | Tratamiento 3<br>( <i>Trichoderma harzianum</i> ) |    |    |    |    | Tratamiento 4<br>( <i>Metarhizium anisopliae</i> ) |    |    |    |    | Tratamiento 5<br>( <i>Beauveria bassiana</i> ) |    |    |    |    |
|                  |                    |                  | P1                              | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                 | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                                | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                                 | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                             | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 20-sep-23        | 33                 | 38               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0                                  | 1  | 1  | 4  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 0  | 0  | 2                                                  | 0  | 2  | 2  | 0  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 22-sep-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0                                  | 2  | 2  | 4  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 0  | 0  | 2                                                  | 0  | 2  | 2  | 0  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 25-sep-23        | 43                 | 37               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 4  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 0  | 0  | 2                                                  | 0  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 27-sep-23        | 41                 | 37               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 4  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 0  | 0  | 2                                                  | 0  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 29-sep-23        | 44                 | 35               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 0  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 02-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 0  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 04-oct-23        | 45                 | 32               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 06-oct-23        | 42                 | 30               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 09-oct-23        | 40                 | 35               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 3  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 11-oct-23        | 43                 | 31               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 3  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 13-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 3  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 16-oct-23        | 41                 | 31               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 3  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 18-oct-23        | 44                 | 29               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 3  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 20-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 3  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 23-oct-23        | 33                 | 39               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 6  | 2  | 2                                                 | 3  | 4  | 2  | 3  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |

|           |    |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25-oct-23 | 55 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |   |
| 27-oct-23 | 42 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 |   |
| 30-oct-23 | 42 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 |   |
| 01-nov-23 | 37 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 4 |   |
| 03-nov-23 | 45 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 |   |
| 06-nov-23 | 48 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 6 |
| 08-nov-23 | 40 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 4 | 6 | 6 |
| 10-nov-23 | 36 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 13-nov-23 | 44 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 15-nov-23 | 38 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 17-nov-23 | 31 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 20-nov-23 | 34 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 22-nov-23 | 54 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 6 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 24-nov-23 | 50 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 4 | 6 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |
| 27-nov-23 | 55 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 4 | 6 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 6 |

**Tabla 7.9-** Datos obtenidos en el bloque 2.

| No. de bloque: 2 |                    |                  |                                 |    |    |    |    |                                    |    |    |    |    |                                                   |    |    |    |    |                                                    |    |    |    |    |                                                |    |    |    |    |
|------------------|--------------------|------------------|---------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------|----|----|----|----|---------------------------------------------------|----|----|----|----|----------------------------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------------------|----|----|----|----|
| Fecha            | % Humedad relativa | Temperatura (°C) | Tratamiento 1<br>(Testigo sano) |    |    |    |    | Tratamiento 2<br>(Testigo enfermo) |    |    |    |    | Tratamiento 3<br>( <i>Trichoderma harzianum</i> ) |    |    |    |    | Tratamiento 4<br>( <i>Metarhizium anisopliae</i> ) |    |    |    |    | Tratamiento 5<br>( <i>Beauveria bassiana</i> ) |    |    |    |    |
|                  |                    |                  | P1                              | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                 | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                                | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                                 | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                             | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 20-sep-23        | 33                 | 38               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 22-sep-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 25-sep-23        | 43                 | 37               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 27-sep-23        | 41                 | 37               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 29-sep-23        | 44                 | 35               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 02-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 04-oct-23        | 45                 | 32               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 06-oct-23        | 42                 | 30               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 09-oct-23        | 40                 | 35               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 11-oct-23        | 43                 | 31               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 13-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 4                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 16-oct-23        | 41                 | 31               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 4                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 18-oct-23        | 44                 | 29               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 4                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 20-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 4                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 23-oct-23        | 33                 | 39               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 4                                  | 4  | 2  | 4  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 4                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |

|           |    |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25-oct-23 | 55 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| 27-oct-23 | 42 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| 30-oct-23 | 42 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| 01-nov-23 | 37 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| 03-nov-23 | 45 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 06-nov-23 | 48 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 08-nov-23 | 40 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 10-nov-23 | 36 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 13-nov-23 | 44 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 15-nov-23 | 38 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 17-nov-23 | 31 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 20-nov-23 | 34 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 22-nov-23 | 54 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 4 | 4 | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 24-nov-23 | 50 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 | 4 | 4 | 6 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |
| 27-nov-23 | 55 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 2 |

**Tabla 7.10-** Datos obtenidos en el bloque 3.

| No. de bloque: 3 |                    |                  |                                 |    |    |    |    |                                    |    |    |    |    |                                                   |    |    |    |    |                                                    |    |    |    |    |                                                |    |    |    |    |
|------------------|--------------------|------------------|---------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------|----|----|----|----|---------------------------------------------------|----|----|----|----|----------------------------------------------------|----|----|----|----|------------------------------------------------|----|----|----|----|
| Fecha            | % Humedad relativa | Temperatura (°C) | Tratamiento 1<br>(Testigo sano) |    |    |    |    | Tratamiento 2<br>(Testigo enfermo) |    |    |    |    | Tratamiento 3<br>( <i>Trichoderma harzianum</i> ) |    |    |    |    | Tratamiento 4<br>( <i>Metarhizium anisopliae</i> ) |    |    |    |    | Tratamiento 5<br>( <i>Beauveria bassiana</i> ) |    |    |    |    |
|                  |                    |                  | P1                              | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                 | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                                | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                                 | P2 | P3 | P4 | P5 | P1                                             | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 20-sep-23        | 33                 | 38               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 22-sep-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 25-sep-23        | 43                 | 37               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 0  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 27-sep-23        | 41                 | 37               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 29-sep-23        | 44                 | 35               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 02-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 04-oct-23        | 45                 | 32               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 06-oct-23        | 42                 | 30               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 09-oct-23        | 40                 | 35               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 11-oct-23        | 43                 | 31               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 13-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 16-oct-23        | 41                 | 31               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 18-oct-23        | 44                 | 29               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 20-oct-23        | 40                 | 36               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 2  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |
| 23-oct-23        | 33                 | 39               | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 2                                  | 4  | 4  | 4  | 4  | 2                                                 | 2  | 2  | 3  | 2  | 2                                                  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2                                              | 2  | 2  | 2  | 2  |

|           |    |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----------|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25-oct-23 | 55 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 27-oct-23 | 42 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 30-oct-23 | 42 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 01-nov-23 | 37 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 03-nov-23 | 45 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 06-nov-23 | 48 | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 08-nov-23 | 40 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 10-nov-23 | 36 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 13-nov-23 | 44 | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 15-nov-23 | 38 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 17-nov-23 | 31 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 20-nov-23 | 34 | 32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 22-nov-23 | 54 | 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 24-nov-23 | 50 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 4 | 6 | 6 | 4 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |
| 27-nov-23 | 55 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 2 | 2 | 2 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 | 2 |

