

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Alternativas Biológicas para el Control *in vitro* del Moho Gris *Botrytis cinerea* de la  
Fresa *Fragaria x ananassa* Dutch

Por

**LIZETH ALEJANDRA VELASCO LÓPEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener su título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Alternativas Biológicas para el Control *in vitro* del Moho Gris *Botrytis cinerea* de la  
*Fresa Fragaria x ananassa* Dutch

Por:

**LIZETH ALEJANDRA VELASCO LÓPEZ**

TESIS

Presentada como requisito para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobado por el comité de Asesoría:

Dr. Epifanio Castro del Ángel  
Asesor Principal

Dr. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Coasesor

M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Coasesor

Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Coordinador Interino de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, Mexico

Mayo 2023

## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir la verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (Corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar, o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas , mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido o sancionado por las autoridades correspondientes. Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



---

Lizeth Alejandra Velasco López

Firma y Nombre

## AGRADECIMIENTOS

A mi ALMA MATER por los mejores años de formación académica que pude tener y por darme la oportunidad de conocer a muchos amigos que se volvieron familia.

Al **Dr. Epifanio Castro del Ángel** por permitirme realizar el proyecto de tesis, por el tiempo brindado y por compartir sus conocimientos.

A la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** por tomarse el tiempo de hacer las revisiones y por sus comentarios.

Al **M.C. Abiel Sánchez Arizpe** por tomarse el tiempo de hacer las revisiones y por sus comentarios al escrito.

A **María Cristina Sánchez Flores** por su apoyo, atención y amistad brindados durante y después de la finalización de este proyecto de tesis.

## DEDICATORIAS

A mi madre:

**Juana López López**, aunque este día parecía lejano cuando nos despedimos en el aeropuerto, ahora lo hemos conseguido. Nunca dejaste de esforzarte para brindarme las cosas que necesitaba y más. Este logro es gracias a ti, a que nunca dejaste de creer en mis sueños, así como en mis capacidades. Tu amor incondicional fue mi inspiración y mi motor en los tiempos difíciles, las despedidas y los sacrificios valieron la pena. Espero haberte llenado de orgullo.

A mis abuelos:

**Mariela López López, Sergio Velasco Rodríguez y Delina García Hernández**, gracias por el cariño y la sabiduría que me compartieron, los atesorare toda la vida.

A mi hermano:

**Carlos Daniel Velasco López** por tu constante apoyo durante mi formación y por ser mi incansable compañero de aventuras.

A mis sobrinos:

**Mateo Velasco Gómez y Darío Velasco Gómez**, a Mateo por ayudarme a coleccionar insectos aun cuando les temía. Espero inspirarlos y hacerlos sentir orgullosos.

A mi novia:

**Erika Velasquez Alvarez**, llegaste cuando menos lo esperaba y siempre estaré agradecida de haber coincidido contigo. Gracias por ser parte de este sueño, gracias por todo tu amor y apoyo durante este largo proceso. Estaré esperando con ansias

verte titulada, logrando aquello que tanto soñaste y, si mi suerte es buena, espero estar ahí contigo.

A mis amigos:

**Odalís, Damian, Alejandro, Tere, Maythe, Litzy, Lipas y Edith** quienes me salvaron un poco la carrera y otro poco la vida.

Al Biologo y Sensei **Carlos Mata**, aunque se ha adelantado en el camino de la vida siempre atesoraré Judo y los amigos que hice a través de este.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	II
DEDICATORIAS .....	III
INDICE DE FIGURAS .....	VII
RESUMEN .....	IX
1.INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Objetivos.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos específicos .....	2
1.2 Hipótesis.....	2
2.REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Importancia nutricional de la fresa .....	3
2.2 Producción nacional.....	3
2.3 Descripción botánica de la fresa .....	3
2.4 Problemas sanitarios en los cultivos de fresa .....	4
2.5 <i>Botrytis cinerea</i> (Moho gris) .....	7
2.6 Generalidades de <i>Trichoderma</i> .....	11
2.7 Genero <i>Bacillus</i> .....	16
2.8 <i>Hamelia patens</i> .....	18
3.MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
3.1 Localización del experimento.....	20
3.2 Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .....	20
3.3 Identificación del hongo .....	20

3.4 Purificación del patógeno de <i>Botrytis cinerea</i> .....	21
3.5 Cepas de antagonistas .....	21
3.6 Cultivos duales de <i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> sobre el patógeno <i>B. cinerea</i> .....	21
3.7 Obtención de los extractos botánicos .....	22
3.8 Preparación de los extractos botánicos .....	23
3.9 Obtención de los Metabolitos Secundarios de cepas de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .....	23
3.10 Obtención de los Metabolitos Secundarios de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .	24
3.11 Bioensayo 1. Actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios de las cepas de <i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> .....	24
3.12 Bioensayo 2. Actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	25
3.13 Bioensayo 3. Actividad inhibitoria de los extractos .....	26
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
4.1 Identificación del fitopatógeno.....	28
4.2 Cultivos duales de <i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> .....	28
4.3 El efecto inhibitorio de los MS de las cepas de <i>T. harzianum</i> , <i>T. longibrachiatum</i> en medios estáticos de quitina, peptona de carne y levadura a 1, 3, 5 y 7 días .....	29
4.4 Efecto inhibitorio de los metabolitos secundarios de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> sobre <i>B. cinerea</i> .....	36
4.5 Efecto antifúngico de los extractos botánicos de <i>H. patens</i> .....	37
5.CONCLUSIONES.....	39
6.LITERATURA CITADA .....	40



## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Porcentaje de inhibición de las cepas antagonistas <i>T. harzianum</i> , <i>T. longibrachiatum</i> y <i>B. amyloliquifaciens</i> sobre <i>B. cinérea</i> .....	29
Fig. 2 Porcentaje de inhibición de <i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> en dosis de 1000 ppm sobre <i>B. cinerea</i> .....	29
Fig. 3 Comparación del porcentaje de inhibición de los medios adicionados con quitina, peptona de carne y levadura. ....	30
Fig. 4 Inhibición de la variable tiempo en concentraciones de 1000 ppm sobre el patógeno <i>B. cinerea</i> .....	31
Fig. 5 Comparación del porcentaje de inhibición de los antagonistas <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en dosis de 2000 ppm sobre <i>B. cinerea</i> .....	31
Fig. 6 Porcentaje de inhibición de los medios adicionados con quitina, peptona de carne y levadura sobre <i>Botrytis cinerea</i> en dosis de 2000 ppm. ....	31
Fig. 7 Comparación del porcentaje de inhibición que la variable tiempo tuvo sobre el patógeno en dosis de 2000 ppm.....	32
Fig. 8 Porcentaje de inhibición de los antagonistas <i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> presentaron sobre el hongo <i>B. cinerea</i> en dosis de 2500 ppm.....	32
Fig. 9 Porcentaje de inhibición que los diferentes medios presentaron sobre <i>Botrytis cinerea</i> en dosis de 2500 ppm. ....	33
Fig. 10 Comparación del porcentaje de inhibición del tiempo sobre el fitopatógeno en dosis de 2500 ppm. ....	33
Fig. 11 Comparación del porcentaje de inhibición de <i>T. harzianum</i> y <i>T. longibrachiatum</i> sobre <i>B. cinerea</i> en dosis de 3000 ppm. ....	34
Fig. 12 Porcentaje de inhibición de los medios adicionados con quitina, peptona de carne y levadura sobre el fitopatógeno <i>B. cinerea</i> en dosis de 3000 ppm.....	34
Fig. 13 Comparación de los porcentaje de inhibición de la variable tiempo en dosis de 3000 ppm sobre <i>B. cinerea</i> .....	35
Fig. 14 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos de metabolitos secundarios de <i>B. amyloliquifaciens</i> sobre <i>B. cinerea</i> .....	37

Fig. 15 Comparación de los porcentaje de inhibición presentadas por el extracto botánico de *H. patens* sobre el patógeno *B. cinerea* usando Metanol y Etanol como solventes..... 38

## RESUMEN

La fresa se ha vuelto muy importante en nuestro país no solo por su sabor y valor nutricional sino también por los trabajos que ofrece a la comunidad local, sin embargo, la producción se ve mermada debido a distintos problemas fitosanitarios entre los que destaca *Botrytis cinerea* o moho gris de la fresa. Este patógeno comúnmente infecta a las plantas de fresa durante la floración y puede permanecer latente durante la postcosecha causando pudriciones blandas en el fruto provocando grandes pérdidas económicas. El control de esta enfermedad se basa principalmente en el uso de fungicidas químicos, aunque en la actualidad las políticas de exportación son cada vez más estrictas aunado a la capacidad de este hongo de desarrollar resistencia a muchas moléculas, por ello, se pretende encontrar alternativas biológicas que permitan inhibir el crecimiento del moho gris. Se evaluó la inhibición de los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Bacillus amyloliquefaciens* al igual que los extractos crudos etanólicos y metanólicos de *Hamelia patens*. Los resultados obtenidos fueron convertidos a porcentaje de inhibición para ser procesados por un análisis de varianza y prueba de Tukey al 0.05 de significancia utilizando el programa SAS 9.0.

Todos los tratamientos de metabolitos secundarios y extractos presentaron una inhibición en distinto porcentaje. No obstante, aquellos tratamientos etanólicos iguales o mayores a 21,428.51 ppm mostraron una inhibición mayor al 80%.

**Palabras clave:** Metabolitos secundarios, *Trichoderma*, *Bacillus*, Extractos botánicos *Botrytis cinerea*.

## 1.INTRODUCCIÓN

La popularidad de las fresas en todo el mundo ha ido en aumento en los últimos años, en la actualidad 76 países la producen. Por su parte, México es el tercer país con mayor producción de fresa solo después de China y EE.UU. (Simpson, 2018).

La delicadeza de las fresas las vuelve especialmente susceptibles a pudriciones causados por hongos durante la postcosecha. Las principales enfermedades de postcosecha de la fresa es *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor* spp., *Colletotrichum* spp., *Penicillium* spp. (Feliziani *et al.*, 2016).

*Botrytis cinerea*, también conocido como moho gris debido a su producción de micelios grises de apariencia polvosa, es considerado como el segundo patógeno fúngico más importante a nivel mundial en términos económicos y científicos (Dean *et al.*, 2012). *Botrytis cinerea* es capaz de desarrollar infecciones inactivas, detener su crecimiento durante un tiempo prolongado y provocar síntomas de enfermedad solo después de la senescencia/maduración de los tejidos del huésped (Van, 2005).

Los grupos químicos para controlar las especies de *Botrytis* son diclofluanida, tiram, pluazinam, boscalid, estrobilurinas. No obstante, el uso de benzimidazoles fenilcarbamatos puede producir una resistencia cruzada (Leroux *et al.*, 2002). Se han propuesto diferentes alternativas naturales que permitan controlar el moho gris en fresa, tales como agentes de control biológico, agentes descontaminantes, compuestos naturales, métodos físicos y sus combinaciones. Con respecto al biocontrol, se ha descubierto que muchos hongos, levaduras y bacterias son eficaces para controlar las enfermedades de *Botrytis* debido a las enzimas y antibióticos que producían (Vagelas *et al.*, 2016). Los hongos del género *Trichoderma* se han estudiado por años debido a su capacidad para actuar contra hongos patógenos. La producción de peptaiboles, péptidos antibióticos, aminoalcoholes en la región C-terminal y modificaciones N-terminales actúan en conjunto para lograr el control sobre otros hongos (Brito *et al.*, 2014).

Distintas cepas de bacterias del género *Bacillus* del total de su genoma entre el 5 y 8% está dedicado a la producción de metabolitos secundarios. Los compuestos más

importantes producidas por *Bacillus* son lipopéptidos sintetizados de forma no ribosomal, péptidos y compuestos policétidos, bacteriocinas y sideróforos (Fira *et al.*, 2018).

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo general

Identificar el moho gris de la fresa y su biocontrol de metabolitos secundarios de *Hamelia patens* Jacq, *Bacillus amyloliquefaciens* Wang y *Trichoderma harzianum* Rifai.

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Aislamiento e identificación del moho gris de la fresa.
2. Evaluar la inhibición *in vitro* con extractos de *Hamelia patens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* mediante la técnica de difusión en placa sobre *Botrytis cinerea*.

## 1.2 Hipótesis

Se espera que al menos uno de los tratamientos tenga efecto significativo en el control *in vitro* del moho gris de la fresa

## 2.REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia nutricional de la fresa

La domesticación de *F. x ananassa* data del siglo XVIII en Europa occidental, resultado de la hibridación de dos especies octaploides silvestres (Hardigan *et al.*, 2021; Edger *et al.*, 2019). Desde entonces la popularidad de esta frutilla ha ido en aumento ya que la fresa no solo es apreciada por su delicioso sabor sino también por ser una fuente de fibra, vitamina C, folato, de micronutrientes y fitoquímicos. La cantidad de estos dependerá de la genética de las fresas, algunos pueden aumentarse mediante el mejoramiento (Giampieri *et al.*, 2013).

### 2.2 Producción nacional

En México durante el 2021, el valor total de la producción de fresa de riego y de temporal fue de \$10,991,159.73 con un área total de 11,935.27 ha sembradas . Donde los tres estados que obtuvieron mayor valor de producción fueron Michoacán con \$6,398,800.50, Baja California con \$2,843,177.71 y Guanajuato con \$1,197,779.98, (SIAP, 2021). Las exportaciones de enero-junio en 2022 incrementó en un 3.84% en comparación del semestre de enero-julio del 2021 con una exportación de 272 mil 172 toneladas de fresa con un valor de 748 millones 843 mil dólares (SIAP, 2022). En el 2023 los avances de siembra y cosechas marcan una reducción de área sembrada para Michoacán pasando de 7,290.73 ha a 5,525.00 ha, en tanto Baja California aumento de 2,088.65 ha a 2,261.80 ha (SIAP, 2023).

### 2.3 Descripción botánica de la fresa

La fresa es una planta perenne, herbácea de la familia Rosaceae. Tienen un sistema de raíz fasciculado cuya profundidad puede ser variada según las condiciones y la presencia de patógenos. Usualmente no sobrepasan los 40 cm, en donde el 90% de estas se encuentra en los primeros 25 cm de profundidad. El tallo está constituido de lo que comúnmente se le conoce como corona, es decir, un eje corto con forma de cono en donde se pueden identificar las escamas foliares. Presenta hojas pecioladas, el limbo está dividido en tres folíolos pediculados con bordes aserrados y presentan una gran cantidad de estomas. Las flores suelen tener de 5 a 6 pétalos, con 20 o hasta 35 estambres. Cada óvulo fecundado da lugar a un engrosamiento del receptáculo floral (Zaragoza, 2013).

## 2.4 Problemas sanitarios en los cultivos de fresa

### 2.4.1 *Tetranychus urticae* (Arañita roja de dos manchas)

La arañita de dos manchas es una plaga fitófaga de gran importancia económica con un reporte de al menos 3877 especies de plantas hospedantes alrededor del mundo, afectando cultivos en campo e invernadero (Attia, 2013). Este acaro se presenta en todas las etapas fenológicas de la fresa, por ello, en México esta una de las plagas de mayor importancia (González-Domínguez, 2015). *T. urticae* se alimenta del contenido celular roturando los tejidos dérmicos de las hojas interfiriendo con el proceso de la fotosíntesis, la transpiración y la conductancia estomática (Campbell *et al.*, 1990; Freitas *et al.*, 2009). El manejo cultural de esta plaga consiste en realizar una rotación de cultivos, la utilización de variedades resistentes y hacer el ambiente menos favorable (Sá-Argolo, 2012). Se tienen registrados 157 depredadores, 11 entomopatógenos y 2 parasitoides, siendo *Phytoseiulus persimilis* y *Neoseiulus californicus* los más utilizados (Sá-Argolo, 2012).

Para el control químico de esta plaga COFEPRIS (2020), tiene un registro de plaguicidas autorizados entre los que podemos encontrar Naled, Bifentrina,

Fenpropatrin, Abamectina, Hexitiazox, Etoxazol, Spiromesifen, Oxidemeton metil, Propargite, por mencionar algunos. El corto ciclo de vida, su reproducción arrenotónica y a la capacidad de las hembras de ovipositar en grandes cantidades y gracias a que su control principal se basa en el uso de plaguicidas y acaricidas químicos ha sido capaz de generar resistencia rápidamente a muchos compuestos (Van Leeuwen *et al.*, 2010).

#### 2.4.2 *Frankliniella occidentalis* (Trips)

También conocido como trips de las flores accidentales, es una plaga cosmopolita de gran importancia de las fresas de túnel y de invernadero ya que se alimentan de los frutos y se reproducen en las flores (Coll *et al.*, 2007). La duración de su ciclo de vida puede durar 24 días con temperaturas de 25°C alcanzando una longevidad entre 60 y 121 días (Cardenas y Corredor, 1989). Además de causar daños en el cultivo, esta especie puede ser vector de distintos virus pertenecientes a los géneros *Ilarvirus*, *Alphacarmovirus*, *Alphacarmovirus* y *Orthotospovirus*, de este último los trips pueden permanecer infectados toda su vida y continuar transmitiendo el virus a las plantas hospedadoras. Los métodos de control se combinan con labores culturales como la eliminación de hospederos alternativos y la colocación de trampas amarillas, azules que reducen la incidencia, así como el uso de insecticidas de amplio espectro como lo son los piretroides, ceocitinoídes, organofosforados y carbamatos, o bien aquellos de espectro reducido como el piridalilo y lufenuron (Otieno *et al.*, 2018). Sin embargo, el abuso de aplicaciones y el pobre programa de rotación de plaguicidas han llevado a producir resistencia a muchos de estos químicos, por ellos, se ha popularizado el control biológico. El control biológico se puede dividir en dos categorías macrobianos (depredadores y parasitoides) y microbianos (entomopatógenos fúngicos y nematodos). Entre los macrobianos podemos encontrar *Orius* spp., fitosidos depredadores y algunas especies de crisopas verde. Por otro lado, tenemos a los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y nematodos como *Steinernema* y *Heterorhabditis*.



#### 2.4.3 *Drosophila suzukii* (Mosquita blanca)

Originarias de Asia, pertenecientes a los dípteros, de una longitud de 2-3 mm de longitud. Con temperaturas de 21.1°C el ciclo de vida puede completarse en poco más de 7 días, en EE.UU. se ha reportado que las hembras pueden ovipositar hasta 160 huevos por día, se han reportado en fresas, moras, frambuesas y cerezas (Escudero, 2014). El principal daño de *D. suzukii* se produce al colocar sus huevecillos en los frutos, donde posteriormente eclosionarán y las larvas se alimentarán de la fruta quitándole todo valor económico a estos, el daño indirecto viene de ser un vector de virus y bacterias que posteriormente provocarán daños al cultivo (Baena *et al.*, 2022). El principal método de control es el químico, las familias de las espinosinas, piretroides, organofosforados y las diamidas han resultado efectivas para proteger de daños por esta mosca hasta por 14 días. Sin embargo, las leyes de cero residuos que cada vez más países implementan han obligado a buscar alternativas para su control (Shawer, 2020; Tait *et al.*, 2021). Jeon (2022) estudió el efecto sinérgico de los tratamientos en frío con fumigación con formiato de etilo en donde los resultados más positivos se obtuvieron que los resultados más positivos se obtuvieron cuando la duración de la exposición a temperaturas frías aumentaba.

#### 2.4.4 *Xanthomonas fragariae* (Mancha angular de la hoja)

Patógeno bacteriano causante de la mancha angular de la hoja. Este patógeno produce lesiones angulares húmedas en la superficie inferior de la hoja que al examinarse a contra sol estas lesiones son translúcidas que posteriormente se tornan rojizas en la superficie superior de las hojas y cuando la enfermedad avanza se puede producir necrosis severa en las nervaduras (Fernández-Pavía, 2014). Para el control de esta enfermedad destacan el control químico y cultural. Saettler (1989), reporta que el uso de Bordeaux, sulfato de cobre, el oxiclورو de cobre y la estreptomycin pueden

ayudar al control siempre y cuando sean aplicados antes de la aparición de los síntomas. Viecelli y Moerschbacher (2013) observaron que la aplicación foliar de manganeso redujo la severidad hasta en un 49% en cultivos de frijol bajo condiciones de invernadero. El uso de tolilfluanida para tratar las semillas reduce la transmisión de esta bacteria tanto en experimentos de laboratorio como en invernadero (Lopes *et al.*, 2008). El control consiste en la rotación de cultivos, la eliminación de malezas hospederas, el uso de semillas libres de esta enfermedad y sistema de riego adecuado, ya que, se ha reportado que el riego por aspersión favorece la dispersión de este patógeno (Darrasse *et al.*, 2007; Gent *et al.*, 2005; Akhavan *et al.*, 2013).

#### 2.4.5 *Colletotrichum* spp. (Antracnosis)

*Colletotrichum* spp. es causante de la enfermedad conocida como antracnosis que reduce la producción y la calidad de las fresas. Este hongo causa manchas irregulares en las hojas, necrosis en los estolones y los peciolos, manchas negras en los frutos, una pudrición en la corona y necrosis en la raíz que más tarde resultará en la muerte de la planta (Freeman *et al.*, 2001). Para el control de este patógeno se usan fungicidas como tiabendazol, imazalil, propiconazol, hexaconazol, carbendazina y bitertanol (Muñoz, 2002). Aunque debido a la capacidad de *Colletotrichum* spp. para desarrollar nuevas estrategias de infección que le han permitido superar los mecanismos inhibitorios de los productos químicos también se han buscado alternativas como la resistencia inducida, tratamientos hidrotérmicos, manipulación genética y el uso de extractos botánicos (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016).

#### 2.5 *Botrytis cinerea* (Moho gris)

*Botrytis cinerea* es el nombre del agente causal del moho gris. Se encuentra dentro de grupo de los patógenos necrotróficos, que puede infectar plantas de ornato, frutales y hortalizas, la enfermedad más común en plantas cultivadas en invernaderos. Se estima

que alrededor del mundo causa una pérdida de entre 10 mil millones y los 100 mil millones de dólares (Hua, 2018).

La secreción de enzimas del orden poligalacturonasas es lo que le permite al hongo degradar la pared celular que se encuentran codificadas por el gen endopoligalacturonasa (Saravanakumar *et al.*, 2021). Agrios (2005) describe que *Botrytis* causa pudriciones en los tallos, raíces, flores, frutos pequeños, los bulbos de varias especies de hortalizas, cormos, manchas foliares, tizón en las inflorescencias y ahogamiento en plántulas. En las fresas el fruto infectado se ablanda, posteriormente el área donde ha colonizado el hongo adquiere una coloración café claro haciendo que el fruto pierda cualquier valor económico.

#### 2.5.1 Descripción del patógeno *Botrytis cinerea*

Saravanakumar *al.* (2021) describe que este hongo sobrevive como macronidias y microconidias, clamidiosporas, esclerocios, ascosporas y apotecios. La fenología de las plantas hospedantes, los hábitos de crecimiento así como los ciclos de enfermedad de las diferentes especies de *Botrytis* están vinculados. Cada estructura del hongo que se encuentre latente o metabólicamente inactivas puede ser parte de algún ciclo de enfermedad (Elad *et al.*, 2007).

## 2.5.2 Taxonomía

Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2023).

Filo: Ascomycota

Clase: Leotiomycetes.

Orden: Helotiales.

Familia: Sclerotiniaceae.

Género: *Botrytis*.

Especie: *cinerea*.

## 2.5.3 Influencia del ambiente

*Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocios y micelios, después se desarrolla sobre los restos de las plantas en descomposición o en cualquier cosa que mueva el suelo. El micelio requiere temperaturas de 18 a 23°C y clima húmedo para que esporule, libere y germinen sus esporas. Aun cuando las cosechas son almacenadas entre 0 y 10°C la actividad del hongo se mantiene (Agrios, 1997).

## 2.5.4 Control químico de *B. cinerea*

Elad (2004) menciona que la forma más popular para el manejo de *Botrytis* es la aplicación de fungicidas en las partes aéreas de las plantas. Aunque la capacidad para adquirir resistencia y la preocupación de los países las repercusiones a la salud pública han ido moderando su uso indiscriminado. Se hacen intervenciones con tiram, maneb, diclofluanida, carbenzadim, fludioxonil y pirimetanil por mencionar algunos, en donde, por temporada puede variar desde uno a veinte aplicaciones. En la clasificación de los botrycidas sintéticos tenemos a los que afectan la respiración fúngica, los tóxicos

atimicrotúbulos, compuestos que afectan la osmorregulación, los que la toxicidad es revertida por aminoácidos y aquellos que son inhibidores de la biosíntesis de esteroides.

#### 2.5.5 Control cultural de *Botrytis cinerea*

Las prácticas culturales para el control de este patógeno varía, entre las más recomendables son la eliminación de los restos vegetales infestados como los infectados, reducir el nivel de humedad mejorando la ventilación dentro de los invernaderos y la calefacción (Agrios, 2005).

Elad *et al.* (1995), mencionan que en estudios experimentales de cultivo de pepino bajo condiciones de invernadero la incidencia de *Botrytis* fue más severa en plantas ubicadas en el centro del invernadero, así como en plantas que poseían dos tallos debido a que los microclimas creados en el centro y en la copa de las plantas con dos tallos la circulación del aire era menor.

Daugaard (1999) menciona que, aunque en fresa no se conoce ninguna variedad resistente si hay diferencias en la susceptibilidad entre ellas. Si bien esto es conocido desde hace varios años, este método de control no había sido de gran relevancia ya que se disponía de una gran variedad de fungicidas.

La luz es un factor fundamental que considerar, ya que las cubiertas de plástico y vidrio permiten el paso de diferente radiación. *Botrytis* forma parte del grupo de hongos que esporulan por debajo de 360 nm, por lo tanto, al colocar una película especial de vinil que bloquee las transmisiones de longitudes de onda inferiores a los 390 nm hace que dicho proceso se detenga (Agrios, 1995). Elad (1997) menciona que en cubiertas con polietileno la reducción de la esporulación se redujo en 35-75%. No obstante, hubo especies de *Botrytis* que lograron esporular en la oscuridad.

La aplicación de micronutrientes puede tener un efecto positivo en el control de enfermedades. En el caso de *Botrytis*, Mogazy (2022), menciona que la aplicación foliar de calcio y de nanopartículas de hierro cada una a 200 ppm redujeron el

crecimiento del patógeno. Yermiyahu (2020) menciona en su estudio que la disminución de la concentración de N y el aumento de Ca en la solución nutritiva disminuyeron significativamente la esporulación de *B. cinera*.

#### 2.5.6 Control biológico

Los agentes de control biológico que se desarrollan van desde organismos vivos como bacterias, hongos, nematodos y virus que ayudan a controlar la población o enfermedades sin dar la cosecha y la salud pública. Los más estudiados son *Bacillus* spp, *Trichoderma* spp, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces lilacinus*. Las bacterias pueden proporcionar de forma indirecta la inducción de la planta o tener directamente interacciones antagónicas con el hongo. Los modos de acción de las bacterias incluyen: síntesis de metabolitos secundarios que degradan la pared celular o producen compuestos volátiles, la competencia por nutrientes y la inducción indirecta de resistencia al huésped (Haidar *et al.*, 2016). Los hongos antagonista, como *Trichoderma* spp, compiten por el sustrato, inducen resistencia a las plantas hospederas, desactivan enzimas del patógeno, realizan microparasitismo o producen antibiosis (Infante *et al.*, 2009).

#### 2.6 Generalidades de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* está compuesta de hongos saprofitos filamentosos que se pueden encontrar en todo el mundo debido a su amplio uso en la agricultura, así como en la biotecnología dado a su habilidad de inhibir la esporulación, la germinación de las esporas y el crecimiento de hongos fitopatógenos (Mesa-Vanegas *et al.*, 2019). Dentro de este género, *Trichoderma harzianum* es la especie más utilizada para el control biológico debido a su capacidad para controlar fitopatógenos en semillas y suelo (Keswani *et al.*, 2013).

### 2.6.1 Descripción de *Trichoderma*

La coloración de las colonias de *Trichoderma* suelen inicialmente ser de color blanco y a medida que envejece puede adquirir un color amarillo a verde oscuro. Visto desde el microscopio el micelio es fino y ralo, presenta conidióforos ramificados con terminaciones filídes donde posteriormente se formarán los conidios. Son haploides y con la pared compuesta de quitina y glucanos, la mayoría de las especies producen clamidosporas que resisten condiciones ambientales adversas (Infante *et al.*, 2005).

### 2.6.2 Clasificación taxonómica de *Trichoderma* (Agrios, 2005)

Reino: Fungí

División: Ascomycota

Orden: Hypocrea

Género: *Trichoderma*

### 2.6.3 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Las especies de *Trichoderma* spp. reconocen a los patógenos de plantas con la ayuda de pequeñas moléculas, como los péptidos, que se liberan por el movimiento de proteasas que son secretadas por *Trichoderma* antes del contacto con el patógeno. A su vez, estas moléculas se unen a los receptores acoplados a proteínas G o receptores sensores de N en la superficie de las hifas de *Trichoderma* que provoca la señalización que comprende proteínas G y proteínas hidrolíticas activadas por mitógeno que además modulan las actividades de factores de transcripción aun desconocidos. Estos factores hacen que posteriormente se aumente la expresión constitutiva de genes que

codifican para la biosíntesis de metabolitos secundarios, así como la lisis de la pared celular (Druzhinina *et al.*, 2011).

#### 2.6.3.1 Micoparasitismo

El hiperparasitismo o micoparasitismo es la habilidad de un hongo para alimentarse de otro. Este fenómeno dependerá del reconocimiento de lectinas de la presa fúngica y, ocurre cuando una especie de *Trichoderma* crece quimiotrópicamente hacia el hongo fitopatógeno en donde gracias a la asociación de un azúcar con la pared del antagonista, las hifas de *Trichoderma* son capaces de adherirse. Para debilitar la pared celular y penetrarla se lleva a cabo el proceso de lisis en el que ocurre una producción de enzimas como las glucanasas, proteasas, lipasas, celulasas y quitinasas (Chet, 1987 citado por Carsolio 1999; Elad *et al.*, 1983). Se considera que el Micoparasitismo se ha terminado cuando el contenido citoplasmático de la célula del hospedante se ha perdido. (Misaghi, 1984 y Adam, 1990 citados por Cruz, 1994).

#### 2.6.3.2 Competencia

La competencia en el control biológico ocurre cuando dos o más microorganismos requieren más de la cantidad de recursos de la que esta disponibles de forma inmediata. El control de *Botrytis* y *Sclerotinia* por *Trichoderma* en la filosfera es de las más conocidas. Estos patógenos comienzan invadiendo tejido de plantas envejecidas o muertas como base nutritiva para posteriormente invadir tejido sano. Rociar las flores durante la floración con *Trichoderma* hacen que colonice el tejido y retrase la infección por *Botrytis* (Dubos, 1987, Gullino, 1992 citados por Hjeljord *et al.*, 1998). Sin embargo, el éxito de las especies de *Trichoderma* se verá afectado por factores ajenos como el clima, la humedad, el viento, el tipo de suelo, el pH, entre otros (Hjeljord *et al.*, 1998). La habilidad de *Trichoderma* para competir por nutrientes varía según la especie, sin embargo, la producción de clamidosporas hace que esté biológicamente adaptado



para sobrevivir en condiciones adversas y de colonizar sustratos de forma agresiva (Pérez, 2004 citado por Infante, 2009; Hjeljord *et al.*, 1998). Estudios realizados por Guigón-López (2010) sobre la tasa de crecimiento, así como el antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre diferentes hongos fitopatógenos demostró que, algunas especies muestran una tasa de crecimiento promedio de 12 a 17 mmd<sup>-1</sup> a una temperatura constante de 25 °C. Además de que, en la comparación de antagonismo de *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* sobre *B. cinerea* y *R. solani* fue *T. longibrachiatum* no solo mostro el menor porcentaje de inhibición de crecimiento, sino que, en algunos casos su micelio fue sobrecrecido por el micelio de *R. solani*.

### 2.6.3 Antibiosis

*Trichoderma* spp. es capaz de producir metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, de los cuales, algunos poseen la capacidad de inhibir a otros organismos sin tener contacto físico. Se han descrito 300 grupos sintetizados por estos hongos filamentosos, entre ellos los peptabioticos y peptaiboles. Dentro de esta clase, se denominan péptidos antibióticos aquellos que muestran actividad antimicrobiana (Daniel, 2007). A continuación, se mencionan algunos metabolitos secundarios involucrados en la inhibición de hongos fitopatógenos.

#### 2.6.3.1 Metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp.

Los metabolitos secundarios (MS) son pequeñas moléculas que, aunque no son necesarias para el desarrollo normal o para el crecimiento del hongo se especula que pueden brindar protección contra otros habitantes en su nicho ecológico. Las agrupaciones más características de los MS son; fenoles, pirógenos, terpenoides, terpenos, policétidos, alcaloides derivados de compuestos indólicos y péptidos no ribosómicos. Diferentes cepas aun siendo de la misma especie pueden presentar diferencias en los mecanismos de acción ya que, los MS varían dependiendo de las

características ambientales y genéticas de los hongos (Gupta *et al*, 2014; Mesa-Venegas, *et al.*, 2019). Los metabolitos tóxicos que se han estudiado hasta ahora son los siguientes:

### Pirones

El piron 6-pentil- $\alpha$ -pirona [6-pp] es un metabolito presente en el purificado de especies como *T. atroviride*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*. Scarselletti & Faull, (1994) estudio los aislamientos de pironas de *T. harzianum* en donde observó una reducción del crecimiento de *Rhizoctonia solani* y de *Fusarium oxysporum* y en dosis de 0,45 mg/ml<sup>-1</sup> se inhibía por completo la germinación de esporas. Worasati *et al.*, (1994) observo que los pirones serán obtenidos del aislamiento de dos cepas de *Trichoderma koningii* redujeron la pudrición por *Rhizoctonia* tanto en condiciones controladas como en campo.

### Koningininas

Las koningininas son piranos complejos que se obtienen del aislado de *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. aureoviride*. Se observó actividad antibiótica in vitro contra *Gaeumannomyces graminis var. Tritici*. Además de inhibir el crecimiento de otros fitopatógenos importantes del suelo, como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium middletonii*, *Fusarium oxysporum* y *Bipolaris sorokiniana* (Vinale *et al.*, 2014).

### Viridin

Es un producto metabólico con propiedades fungistático principalmente de cepas de *T. viride*. Este material activo muestra un grado de especificidad muy marcado en cuanto a sus efectos fungistáticos se refiere. Se necesitan 0-006 pg./ml para prevenir la germinación de conidios de *B. allii* y 6-25/μg/ml para inhibir la germinación de conidios de *Penicillium expansum* (Brian *et al.*, 1946).

## Compuestos heterocíclicos de nitrógeno

La harzianopiridona es un metabolito producido por *T. harzianum* que posee un sistema de anillo de piridina penta sustituido por un patrón de 2,3-dimetoxi-4-piridinol, un fuerte antibiótico activo contra *R. solani* y *B. cinerea* (Dickinson *et al.*, 1989).

## 2.7 Genero *Bacillus*

Estas bacterias son aerobias, ocasionalmente anaerobias facultativas, gran positivas que presentan morfología bacilar de tamaño variable de 0.5 a 10 μm y movilidad flagelar. El pH óptimo para su crecimiento es neutro, la mayoría de ellas crecen en temperaturas de 30 a 45°C.

El estudio de agentes de control biológico ha conducido a conocer más los mecanismos utilizados que controlan el crecimiento, desarrollo e infección de agentes fitopatógenos en distintos cultivos de importancia económica. Los mecanismos que destacan se encuentran el hiperparasitismo, predación, la producción de fenazinas, lipopéptidos cíclicos, quitinasas, glucanasas, proteasas, amoniaco, cianuro de hidróxido, además de competir por espacio y nutrientes y la inducción de respuesta sistémica en la las plantas mediante la producción de fitohormonas. Un gran porcentaje del genoma de cepas del cenero *Bacillus* está ampliamente relacionado a la producción de metabolitos secundarios asociados con el control de fitopatógenos. Un

ejemplo de lo anterior es el caso de *B. amyloliquefaciens* FZB42 con un 8.5% y *B. subtilis* 168 con un 4% (Thomashow, *et al.*, 1990).

### 2.7.1 Mecanismos de acción de *Bacillus* spp contra fitopatógenos

### 2.7.2 Fitoestimuladores

Algunas bacterias estimulan el crecimiento de las plantas a través de la producción de auxinas durante la ausencia de fitopatógenos. Un ejemplo de ello son las especies de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, y *Enterobacter cloacae*, que promueven el crecimiento de las plantas por medio de la liberación de sustancias volátiles (Lutenberg y Kamilova, 2009 citado por Ochoa *et al.*, 2010)

### 2.7.3 Producción de sustancias antimicrobianas

Diferentes especies del género *Bacillus* son capaces de producir sustancias antimicrobianas que pueden clasificarse en tres diferentes grupos: de péptidos de síntesis ribosomal, moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal, y policétidos (Fickers, 2012). Los péptidos de síntesis ribosomal, también conocidos como bacteriocinas, que más se han investigado son subtilina y subtilosina A. Así mismo se ha reportado que *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, por mencionar algunas, producen una gran variedad de bacteriocinas con actividad antibacteriana contra el deterioro de los alimentos y otros fitopatógenos (Lee y Kim, 2011).

Los péptidos no ribosomal o NRPs por sus siglas en inglés, se encuentra como productos incluidos en la división de los metabolitos secundarios que poseen propiedades como toxinas, pigmentos, antibióticos, sideróforos, inmunosupresores, citostáticos, entre otros. Los NRPs son usados en la medicina humana, en la

restauración del medio ambiente y protección de cultivos (Martinez-Núez y López, 2016).

#### 2.7.4 Producción de Sideróforos

Se ha reportado que especies como *B. subtilis* y *B. megaterium* realizan la producción de siderofos bacilibactina, ácido itoico ácido 2,3-dihidroxibenzoico. Esos metabolitos son hacen que puedan adquirir el hierro más fácilmente a diferencia del resto de organismos, lo que representa una ventaja al momento de combatir enfermedades fitopatógenas en cultivos de importancia económica (Tejera-Hernandez *et al.* 2011).

#### 2.7.5 Enzimas líticas

*Bacillus* spp tiene la capacidad de degradar la pared celular de algunos organismos ya que es capaz de producir enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas, P-glucanasas, calulasas, dehidrogenases, exo y endopoligalacturonasas, fosfatasas, lipasas, etc. Tejera-Hernandez *et al.* (2011) observo metabolitos como lipasas, proteasas y  $\beta$ -glutanasa producidos por *B. subtilis* que poseen la capacidad de actuar sobre *Fusarium oxysporum*. Por su parte, Yan *et al.* (2011) observo que el sobrenadante de la cepa SL-13 de *B. subtilis* inhibió el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, que pruebas posteriores arrojaron que las principales enzimas en dicho sobrenadante fueron quitinasas.

#### 2.8 *Hamelia patens*

*Hamelia patens* es una planta ornamental perteneciente a la familia *Rubiaceae* y originaria de América tropical. Es un arbusto leñoso perene que puede crecer entre 6

a 12 pies de alto con hojas simples elípticas u ovaladas de color verde claro o verde oscuro y en ocasiones varían a púrpura o rojo, peciolo corto y margen ondulado. Las flores son tubulares de coloración rojo anaranjado o amarillas. Se puede propagar mediante esquejes o semillas. Su distribución va desde Florida hasta Paraguay (Elias y Pooler, 2004; Brown y Hammer, 2014; citados por Kaushik y Singh, 2020). Rodríguez y Castro (2021) reportan que *Hamelia patens* puede reducir el crecimiento de *Rhizoctonia solani* en concentraciones iguales o mayores a 500 mg/litro de agua donde la inhibición superaba el 70%.

### 2.8.1 Propiedades medicinales

Se ha demostrado que *Hamelia patens* tiene contenidos de isopteropodina, palmirina, rumberina, maruquina, alcaloide A, B Y C, apigenina flavanonas, narirutina, efedrina, ácido rosmarínico, narirutina, seneciofilina, taninos, etc. Por ello, se han hecho estudios de diferentes extractos de distintas partes de *Hamelia patens* con fines farmacológico en el que se ha observado actividades antioxidantes, cicatrizantes, antimicrobianas, antidepresivas, antihelmínticas, antilitiáticas, inhibidores de la acetilcolinesterasa, hepatoprotectores, cicatrizantes y citotóxicas (Kaushik y Singh, 2020). En los últimos años, científicos e investigadores de la India han estudiado las propiedades farmacológicas de distintas partes de la planta usando diferentes solventes como el cloroformo, etanol, éter de petróleo y benceno (Ahmad *et al.*, 2012).

### 3.MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Localización del experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

#### 3.2 Aislamiento de *Botrytis cinerea*

Se recolectaron fresas de invernadero con signos visibles de *Botrytis cinerea* que posteriormente, en el laboratorio, mediante la técnica de punta de hifa en medio nutritivo Agar de Dextrosa y Papa (PDA) se aisló el patógeno.

Los materiales que se necesitan para la siembra deben estar previamente esterilizados, para cumplir con todo, esto se prendió la campana de flujo laminar por 30 min antes de usarse y se desinfectó con alcohol etílico al 96% para descontaminar el microambiente. Para la germinación del hongo se proporcionó la temperatura adecuada colocando las cajas en la incubadora a una temperatura de 26°C por 7 días.

#### 3.3 Identificación del hongo

En este trabajo es necesario, auxiliarse de dos microscopios, uno compuesto para observar las estructuras fungosas y el otro de disección (estereoscopio) para observar las colonias del hongo y basándose en la descripción de Barnett y hunter (1998) sobre las características de *Botrytis*.

En el procedimiento de identificación bastó con obtener una pequeña porción del hongo, con la ayuda de una aguja de disección y se colocó en un portaobjetos con

lactofenol, posteriormente se acomodó un cubreobjeto sobre la muestra y se observó en el microscopio compuesto para definir con mayor exactitud que es el microorganismo deseado.

Las características morfológicas deben coincidir con las descritas para *B. cinerea*, que son: son micelio, conidióforos, conidios y esclerocios (Jarvis, 1997; Beever y Weeds, 2007; Mirzaei *et al.*, 2008 ).

### 3.4 Purificación del patógeno de *Botrytis cinerea*

Se purificó mediante cultivos monoconidiales. Con el sacabocados se obtuvieron dos discos del margen de las colonias de *B. cinerea* y se depositaron en tubos de ensaye con 9 ml de agua destilada estéril y se sembraron 1000 µl por dispersión con una varilla de vidrio en medio de agar nutritivo, a las 24h se extrajo un solo conidio germinado y se colocó en cajas con el medio de cultivo antes mencionado.

### 3.5 Cepas de antagonistas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Bacillus amyloliquefaciens* proporcionadas por el laboratorio de fitopatopatología.

### 3.6 Cultivos duales de *T. harzianum* y *T. longibraquiatum* y *Bacillus amyloliquefaciens* sobre el patógeno *B. cinerea*

Se reactivaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), se esperó el crecimiento micelial y posteriormente se evaluó la capacidad de antagonismo mediante cultivos duales. El cultivo dual de las cepas de *Trichoderma* spp consistió en colocar en un extremo de una caja Petri, que contenía PDA, un disco de agar de 4 mm con



micelio de *B. cinerea* y en el extremo opuesto un disco de 4 mm de agar con micelio del antagonista *Trichoderma*. Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 26°C, en donde la toma de datos se realizó cada 24 horas. La evaluación de los cultivos duales se detuvo cuando el antagonismo cubrió por completo el hongo patógeno.

La técnica de cultivo dual para *B. amyloliquefaciens* consistió en inocular a la bacteria en dirección de los cuatro puntos cardinales de una caja Petri con PDA y, en el centro de ésta se posicionó un disco de 4 mm de agar con micelio de *B. cinerea*. Los cultivos se llevaron a la incubadora a 26°C con una toma de datos a cada 24 horas hasta que el testigo llenó la caja.

Para calcular el porcentaje de inhibición de *Bacillus amyloliquefaciens* se utilizó como referencia el crecimiento de las cajas testigo, transformando así también los datos obtenidos de la de la evolución del crecimiento radial de *B. cinerea* y aplicando la siguiente ecuación (Hernández-Castillo *et al.*, 2008):

$$PI = 100 - [(Cr * 100)/Rp]$$

Donde:

PI = inhibición del crecimiento del hongo;

Cr = crecimiento micelial del hongo;

Rp = radio de la placa

Una vez evaluada la actividad antagónica, se procedió a resembrar los antagonistas en medio PDA, los cuales se utilizaron para el control de *B. cinerea* en fresas frescas.

### 3.7 Obtención de los extractos botánicos

Las plantas de *Hamelia patens* se llevaron al laboratorio en donde se le quitaron las hojas y se desechó el resto. Las hojas se secaron por 10 días antes de realizar la pulverización con la licuadora. Para evitar que los compuestos que *H. patens* se

degradaran con la luz, se resguardo el polvo vegetal que se obtuvo en frascos de vidrio ámbar.

### 3.8 Preparación de los extractos botánicos

Para la preparación de los extractos botánicos de *H. patens* a base metanol (MetOH) y etanol (EtOH) se utilizaron dos matraces Erlenmeyer de 1000 mL, en donde, se le agregaron 70 g del polvo vegetal previamente pesado a cada uno de los matraces para luego agregar 700 mL del solvente. Posteriormente se le colocó un tapón de algodón y se cubrió con papel estraza para proteger los compuestos fotosensibles, se colocó sobre una paca termoagitadora por 7 días. Pasado el tiempo, para eliminar las impurezas, se filtró el sobrenadante con papel filtro Whatman no. 1.

### 3.9 Obtención de los Metabolitos Secundarios de cepas de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*.

Para producir los metabolitos secundarios, en condiciones de asepsia, se colocaron cuatro discos de 4 mm de agar con micelio de *Trichoderma* spp en tres medios de caldo de papa más dextrosa estáticos; quitina, levadura y peptona de carne. La producción de metabolitos se evaluó a 1, 3, 5 y 7 días a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo requerido, se procedió a separar el sobrenadante líquido de la parte solida con ayuda de papel filtro. El resultante se llevó a la centrifugadora a 4000 revoluciones por minuto para quitar la mayor cantidad de impurezas. Después se utilizó un filtro millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  para asegurar la separación de las células bacterianas. Finalmente se vertió 100 microlitros del caldo de metabolitos en una caja Petri con PDA para incubarse a 26°C por 48 horas y al no observarse crecimiento de ningún organismo se comprobó la pureza.

### 3.10 Obtención de los Metabolitos Secundarios de *Bacillus amyloliquefaciens*

La producción de los Metabolitos Secundarios (MS) se inició en una campana de flujo laminar, raspando suavemente con un asa de Kolle una colonia de *B. amyloliquefaciens* para después agitarla en un caldo de papa más dextrosa anteriormente realizada. Se dejó en condición estática a temperatura ambiente por 7 días, para luego centrifugar el sobrenadante a 4000 revoluciones por minuto. Posteriormente, para asegurar un caldo libre de bacterias se purificó con un filtro millipore de 0,22 µm. La evaluación del grado de pureza se llevó a cabo colocando 100 microlitros del caldo en una caja de Petri con PDA en donde se dispersó con un asa de vidrio. La caja se dejó en la incubadora a una temperatura de 26°C durante 48 horas en donde no se observó crecimiento de algún organismo.

### 3.11 Bioensayo 1. Actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios de las cepas de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*

Para evaluar el efecto de inhibición de estas cepas se usó la técnica de difusión en placa. En el centro de la caja Petri con medio de cultivo PDA mezclado con caldo de metabolitos secundarios de *Trichoderma harzianum* se colocaron discos de agar con presencia de micelio de *B. cinerea*. Las cajas inoculadas se incubaron a 26°C hasta que el crecimiento del patógeno en la caja testigo (PDA sin metabolitos secundarios) llenó la placa. El efecto inhibitorio de los metabolitos sobre *B. cinerea*, fue analizado con los datos recabados de cuatro puntos de medición del crecimiento micelial, la medición se suspendió cuando el testigo patógeno llenó la caja Petri. Se evaluó el porcentaje de inhibición a nivel cepa, a nivel medio y a nivel tiempo en concentraciones de 1000, 2000, 2500 y 3000 ppm, cada uno con tres repeticiones distribuidos completamente al azar.

Para evaluar el efecto de los metabolitos secundarios *Trichoderma longibrachiatum* se repitió el mismo procedimiento considerando los mismos parámetros anteriormente mencionados.

El porcentaje de inhibición para ambos caldos de metabolitos secundarios de *T. hamzianum* y *T. longibrachiatum* se obtuvo transformando los datos de los cuatro puntos cardinales recabados anteriormente utilizando como referencia el crecimiento del tratamiento testigo desarrollando la ecuación que a continuación se describe (Hernández-Castillo *et al.*, 2008):

$$PI = 100 - [(Cr * 100)/Rp]$$

Donde:

PI = inhibición del crecimiento del hongo;

Cr = crecimiento micelial del hongo;

Rp = radio de la placa

Los datos obtenidos se procesaron en el programa SAS versión 9.0 realizando la prueba de Tukey al 0.05 de significancia.

### 3.12 Bioensayo 2. Actividad inhibitoria de los metabolitos secundarios de *Bacillus amyloliquefaciens*

El método elegido para la evaluación del efecto inhibitorio de *B. amyloliquefaciens* fue por difusión en placa. Esta técnica consiste en mezclar el medio PDA con el caldo de los metabolitos secundarios. Una vez solidificados, en el centro de la caja Petri se colocó un disco de 4 mm de agar con micelio activo de *B. cinerea*. Se evaluaron concentraciones de 7,142.85; 11,428.57; 14,285.71; 21,428.51 y 35,714.28 ppm más un tratamiento testigo (PDA) con tres repeticiones distribuidas completamente al azar. Las cajas se incubaron a una temperatura de 26°C, la toma de datos se llevó a cabo cada 24 horas midiendo cuatro puntos basados en los puntos cardinales. La

evaluación se detuvo cuando el hongo llenó en su totalidad la caja del tratamiento testigo.

Hernández-Castillo *et al.*, (2008) menciona que empleando como referencia el crecimiento de la placa testigo, además de transmutar los datos recabados del crecimiento radial del patógeno y usando la ecuación que se describe a continuación se pudo determinar el porcentaje de inhibición de los metabolitos secundarios de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre *B. cinérea*. Al porcentaje de inhibición obtenido se le realizó una prueba de Tukey con 0.05 de significancia a través del programa SAS versión 9.0

A continuación, se describe la ecuación descrita por Hernández-Castillo *et al.*, (2008):

$$PI = 100 - [(Cr * 100) / Rp]$$

Donde:

PI = inhibición del crecimiento del hongo;

Cr = crecimiento micelial del hongo;

Rp = radio de la placa

### 3.13 Bioensayo 3. Actividad inhibitoria de los extractos

El efecto inhibitorio se evaluó por la técnica de difusión en placa. Se utilizó extractos a base de agua, etanol y metanol (crudos). Discos de agar con micelio con crecimiento activo del fitopatógeno de interés se colocaron en el centro de la placa Petri con medio de cultivo PDA mezclado con el extracto. Las cajas inoculadas se incubaron a 26 °C hasta que el crecimiento del micelio de la caja testigo (PDA sin extracto) llenó la placa. El radio del crecimiento micelial se determinó cada 24 h. Los resultados obtenidos del crecimiento radial fueron transformados a porcentaje de inhibición usando como referencia el crecimiento del hongo testigo (sin antagonista) y desarrollando la siguiente ecuación (Hernández-Castillo *et al.*, 2008):

$$PI = 100 - [(Cr * 100) / Rp]$$

Donde:

PI = inhibición del crecimiento del hongo;

Cr = crecimiento micelial del hongo;

Rp = radio de la placa

Se evaluaron concentraciones (tratamientos) (7142.85 ppm, 11428 ppm, 14,285.71 ppm, 21,428.51 ppm, 35,714.28 ppm, 50,000 ppm, 71,428.57 ppm del extracto); tres extractos crudos, Etanol (EtOH) y Metanol (MetOH). El experimento fue distribuido en un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por cada tratamiento, la separación de las medias se realizará mediante la prueba de Tukey al 0.05 de significancia en el programa SAS versión 9.0 para Windows.

## 4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación del fitopatógeno

Las montas del *Botrytis* vistas desde el microscopio coincidieron con las descripciones hechas por Barnett y hunter (1998), el hongo creció de forma uniforme presentando micelio de color gris, los conidióforos fueron altos, septados, hialinos y ramificados sobre los que se crecieron conidios agrupados de forma ovoide y de aspecto hialino. La velocidad de crecimiento fue de 7 días para cubrir completamente la caja Petri. Al cabo de aproximadamente 15 días comenzaron a formarse los esclerocios con forma irregular y una coloración oscura (Jarvis, W.R. 1997; Lorenzini & Zapparoli 2014).

Aunque todas las especies de *Botrytis* spp producen esclerocios estos varían de tamaño y forma dependiendo de las condiciones de aislamiento y cultivo. El exterior de los esclerocios de *Botrytis cinerea* se compone de hifas de paredes gruesas y juntas que se proyectan hacia la superficie. El exterior está cubierto casi por su totalidad por una película de lo que parece ser pigmento (Willetts, 1969).

### 4.2 Cultivos duales de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum*

En la figura 1 podemos observar el porcentaje de inhibición en cultivos duales donde las cepas *T. harzianum* y *B. amyloliquefaciens* alcanzaron porcentajes similares con 60.25 y 58.75% respectivamente, mientras que *T. longibrachiatum* alcanzó solamente 35% de inhibición, poco más de la mitad de lo que alcanzaron los otros antagonistas.

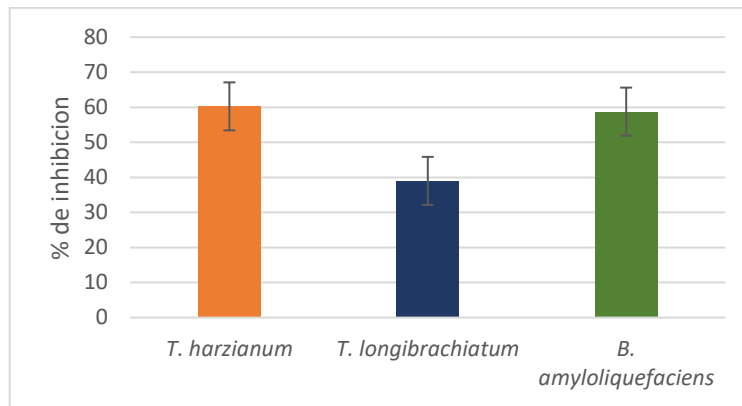


Fig. 1 Porcentaje de inhibición de las cepas antagonistas *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *B. amyloliquefaciens* sobre *B. cinérea*

#### 4.3 El efecto inhibitorio de los MS de las cepas de *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* en medios estáticos de quitina, peptona de carne y levadura a 1, 3, 5 y 7 días

En la figura 2 se nos muestra el efecto de crecimiento *B. cinerea* expuesto a una concentración 1000 ppm de metabolitos secundarios de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum*. Aunque las diferencias en cuanto a la inhibición son mínimas, la cepa que mostró mayor inhibición fue la cepa 1, es decir, *Trichoderma harzianum* con una inhibición del 20.295% en comparación de *Trichoderma longibrachiatum* que tuvo una inhibición del 19.74%.

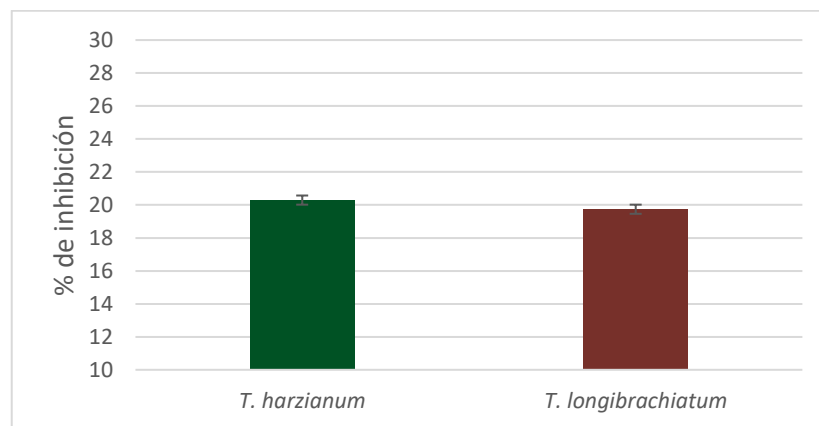


Fig. 2 Porcentaje de inhibición de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* en concentración de 1000 ppm sobre *B. cinerea*



La segunda variable para considerar fue a nivel de medios usados que se puede observar en la figura 3, en donde, el medio al que se le adicionó levadura mostró mayor nivel de inhibición con un 24.089% con respecto a los porcentajes de inhibición de los medios de quitina y levadura que obtuvieron un 17.292 y 18.672% respectivamente.

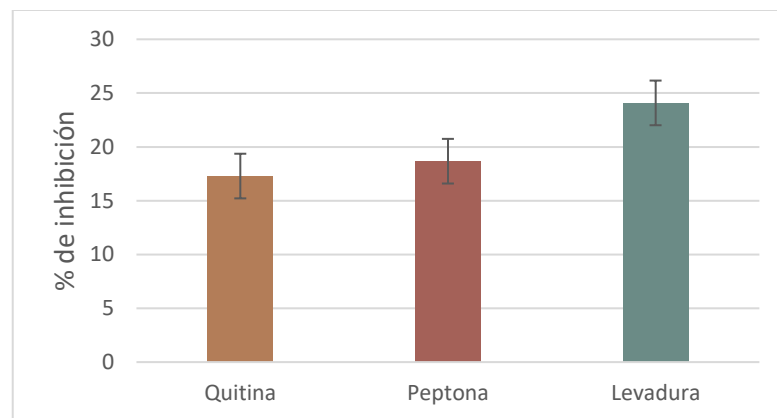


Fig. 3 Comparación del porcentaje de inhibición de los medios adicionados con quitina, peptona de carne y levadura.

En la figura 4 se observa el ultimo parámetro a medir, el cual fue a nivel de tiempo. En él podemos apreciar que el tratamiento más eficiente se dio a los 5 días con un porcentaje de 24.583%.

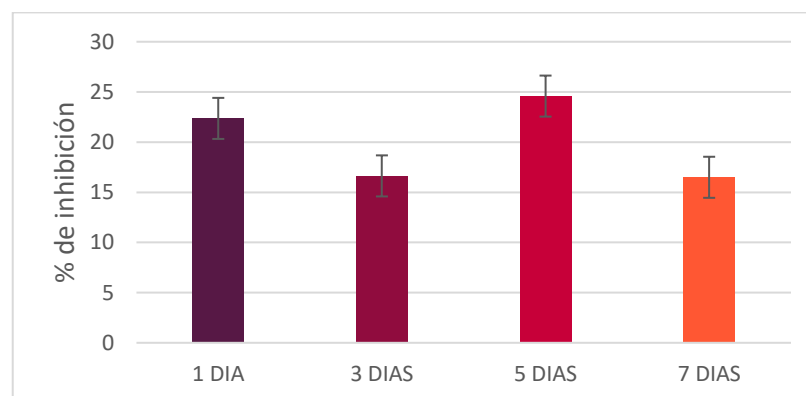


Fig. 4 Inhibición de la variable tiempo en concentración de 1000 ppm sobre el patógeno *B. cinerea*

En la figura 5 se muestra el patógeno expuesto a una concentración de 2000 ppm. La cepa de *T. harzianum* mostró un 17.847% de inhibición.

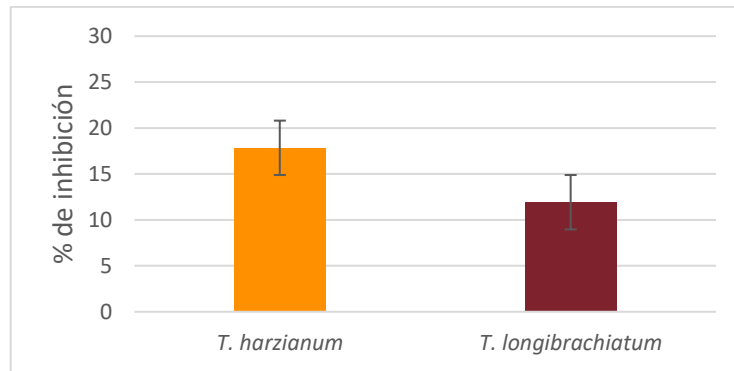


Fig. 5 Comparación del porcentaje de inhibición de los antagonistas *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma longibrachiatum* en concentración de 2000 ppm sobre *B. cinerea*.

El nivel de inhibición a nivel de medio se observa en la figura 6, siendo el medio de levadura quien presenta mayor inhibición con un 19.74%.

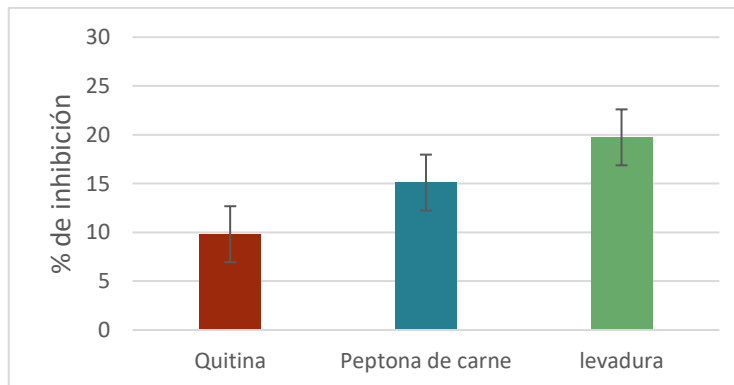


Fig. 6 Porcentaje de inhibición de los medios adicionados con quitina, peptona de carne y levadura sobre *Botrytis cinerea* en concentración de 2000 ppm.

Mientras que en el factor tiempo, observado en la figura 7, el mejor tratamiento fue a las 24 horas con 24.271% de inhibición.

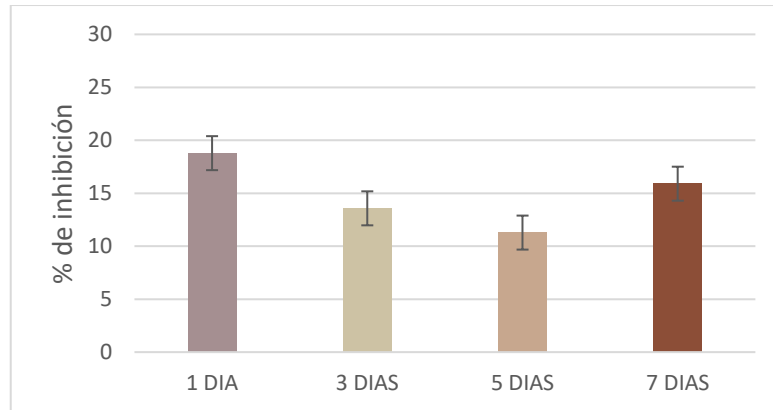


Fig. 7 Comparación del porcentaje de inhibición que la variable tiempo tuvo sobre el patógeno en concentración de 2000 ppm.

El crecimiento de *B. cinerea* expuesto a una concentración de 2500 ppm de metabolitos secundarios se observa en la figura 8, mostrando que la cepa de *T. harzianum* tiene porcentajes de inhibición de 14.844% frente a 10.521% de *T. longibrachiatum*.

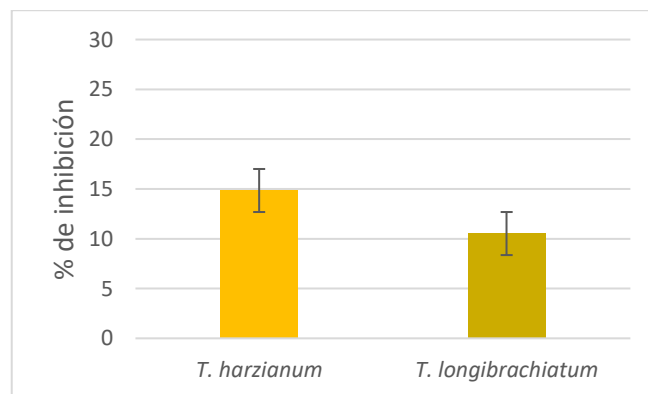


Fig. 8 Porcentaje de inhibición de los antagonistas *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* presentaron sobre el hongo *B. cinerea* en concentración de 2500 ppm.

En la figura 9 se muestra que el medio de levadura con alcanzó 16.901% de inhibición seguido de peptona de carne con 13.62% y por último quitina con 7.526%.

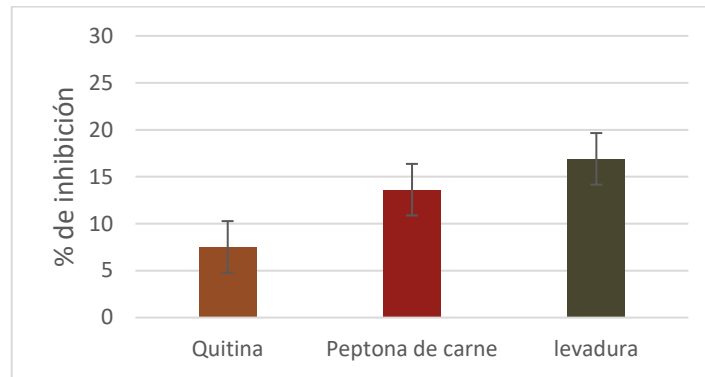


Fig. 9 Porcentaje de inhibición que los diferentes medios presentaron sobre *Botrytis cinerea* en concentración de 2500 ppm.

La última variable fue el tiempo, donde el mejor fue el de 5 días con 20.59% de inhibición como se muestra en la figura 10.

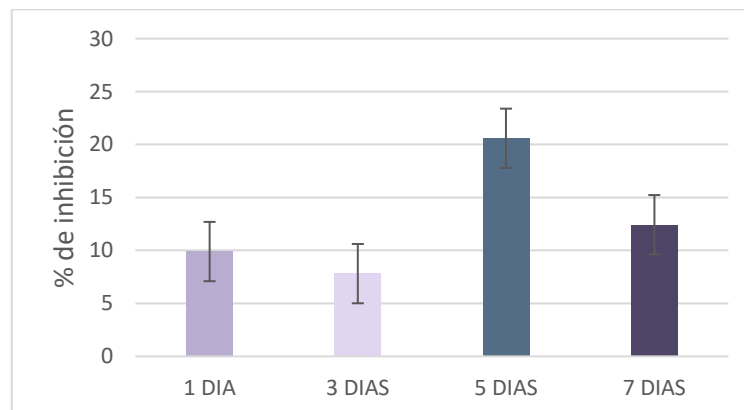


Fig. 10 Comparación del porcentaje de inhibición del tiempo sobre el fitopatógeno en concentración de 2500 ppm.

En la figura 11 se observa como los metabolitos secundarios de la cepa de *T. harzianum* sobre el crecimiento de *B. cinerea* a una concentración de 3000 ppm tuvieron un efecto inhibitorio del 18.021%.

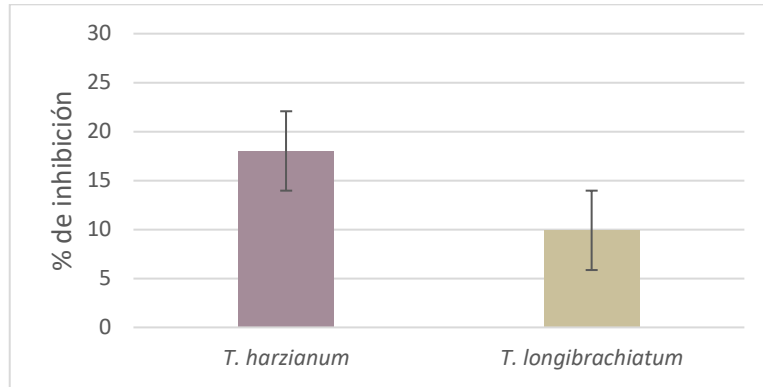


Fig. 11 Comparación del porcentaje de inhibición de *T. harzianum* y *T. longibrachiatum* sobre *B. cinerea* en concentración de 3000 ppm.

En la figura 12 se observa que el medio de levadura tuvo un 20% de inhibición seguido de quitina con un 12% y por último peptona con un 9.896%.

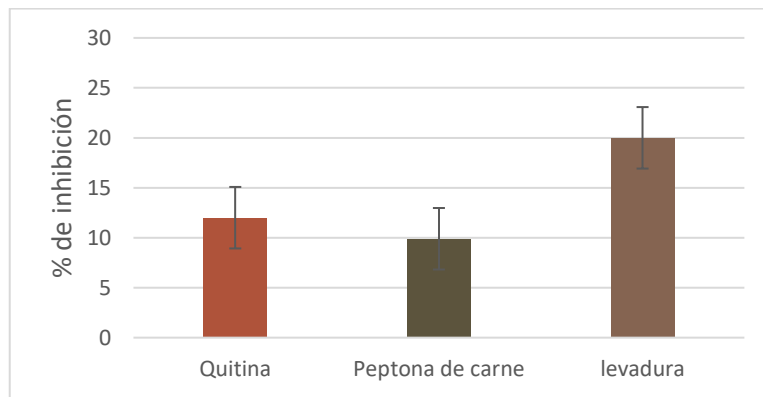


Fig. 12 Porcentaje de inhibición de los medios adicionados con quitina, peptona de carne y levadura sobre el fitopatógeno *B. cinerea* en concentración de 3000 ppm.

Finalmente, en la figura 13 observamos que en la variable tiempo el de 7 días fue superior con 24.271%, seguido por el de 5, 3 y 1 día.

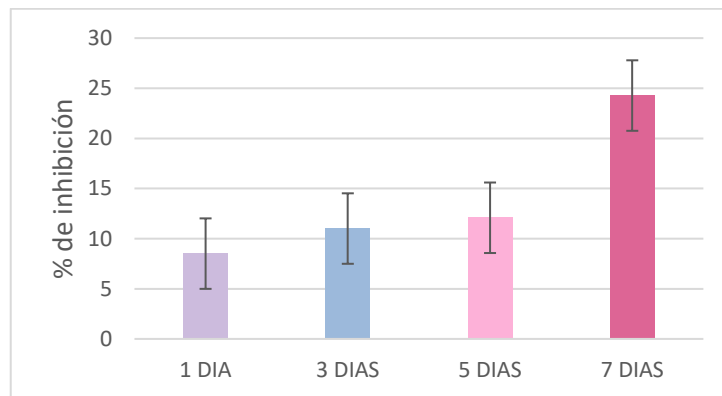


Fig. 13 Comparación del porcentaje de inhibición de la variable tiempo en concentración de 3000 ppm sobre *B. cinerea*.

Sharaf *et al.* (2012) y Cepeda (2010) mencionan el uso de quitina, peptona y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno orgánico en la producción de quitinasas como metabolitos secundarios en hongos filamentosos. Nampoothiria (2004) realizó estudios sobre la optimización de procesos para la producción de quitinasas antifúngica por *Trichoderma harzianum* en donde la actividad máxima de quitina se dio a las 96 horas a una temperatura de 30°C en sustrato de salvado de trigo humedecido con solución salina adicionando quitina coloidal y extracto de levadura. En estudios sobre la caracterización bioquímica de *Trichoderma* realizados por González *et al.* (2010) donde se evaluó la actividad enzimática de las proteínas hidrolíticas de los sobrenadantes de medios basales líquidos adicionando quitina coloidal, peptona de carne y levadura obtuvieron que el medio más ventajoso para obtener quitinasas fue aquel que se le adicionó quitina. El uso del exoesqueleto de camarón para inducir la producción de quitinasas se ha empleado desde hace ya un par de décadas. Shimahara (1988) señala que la quitina de la cutícula de los crustáceos está asociada con proteínas, lípidos, sales inorgánicas y pigmentos. Por lo

que para poder aislar la quitina se requiere un procedimiento de desmineralización, deproteinización y finalmente eliminación de lípidos con solventes. En el presente estudio el exoesqueleto del camarón no pasó por dicho procedimiento, por lo que se puede especular que, la baja inhibición pudo deberse a las sales inorgánicas, lípidos y proteínas remanentes del camarón que inhibieron la producción de quitinasas. Ngo *et al.* (2021) reporta que el filtrado del cultivo de *T. longibrachiatum* SFC100166 inhibió de manera efectiva el moho gris del tomate, el tizón del arroz y el tizón tardío del tomate, pero el hongo con mayor sensibilidad a los compuestos aislados fue *Phytophthora infestans* en dosis de 6,3 y 400 µg/mL. Ahluwalia *et al.* (2014) observó que de los aislados de metabolitos secundarios de *Trichoderma harzianum*, el aislado de harzianopiridona inhibió el 90% del crecimiento de *R. solani*, *F. oxysporum* y *S. rolfsii* en dosis de 35.9– 50.2 µl, no obstante, fue menos activo que el fungicida carbendazim.

#### 4.4 Efecto inhibitorio de los metabolitos secundarios de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre *B. cinerea*

Se evaluaron las concentraciones 7,142.85; 11,428.57; 14,285.71; 21,428.51 y 35,714.28 ppm. de los metabolitos secundarios de *B. amyloliquefaciens*. En la figura 14 podemos observar que el porcentaje de inhibición es mínima siendo la concentración de 35,714.28 ppm quien tuvo el mayor porcentaje de inhibición con un 5%. El porcentaje de inhibición fue disminuyendo a medida que las concentraciones eran menores, por lo que 21,428.51 y 14,285.71 ppm alcanzaron 4.5 y 3.33% respectivamente. Mientras que las dosis de 11,428.57 y 7,142.85 ppm alcanzaron el mismo porcentaje de inhibición, que fue solo de 1.45%. Salvatierra-Martinez *et al* (2018) estudió los efectos de los metabolitos volátiles sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea* aplicando alícuotas de 5 µl de cultivo bacteriano en las tapas con el patógeno en el centro de la base y observó una inhibición del 70% por cuatro días, no obstante, en el quinto día, el hongo comenzó a degradar estos metabolitos y prosiguió con su crecimiento normal.

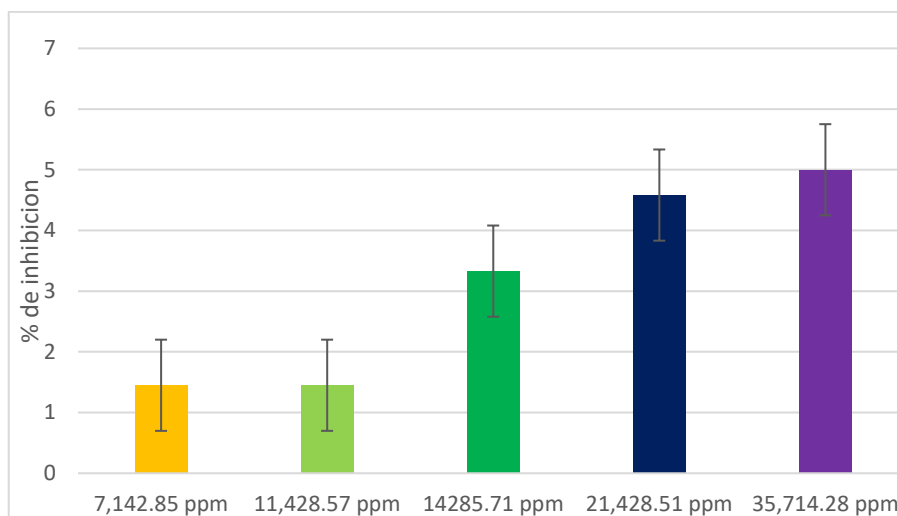


Fig. 14 Porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos de metabolitos secundarios de *B. amyloliquefaciens* sobre *B. cinerea*

#### 4.5 Efecto antifúngico de los extractos botánicos de *H. patens*

La comparación de la actividad inhibitoria de los extractos botánicos etanólicos y metanólicos se encuentra en la figura 13, donde podemos observar que etanólico tuvo una inhibición del 100% a partir de 35 714.28 ppm, mientras que el extracto metanólico alcanzo una inhibición del 100% a partir de dosis de 50,000 ppm. En el extracto etanólico las concentraciones de 21,428.51 ppm, 14,285.71 ppm 7,142.85 ppm tuvieron un efecto inhibitorio de 90.42, 46.25 y 28.75% mientras que el extracto metanólico tuvo una inhibición del 80.83, 11.66 y 18.125%. El extracto metanólico mostró un mayor porcentaje de inhibición en las dosis de 11,428.57 ppm donde obtuvo hasta 39.166% en comparación con el 33.13% del extracto etanólico. Rugerio (2013) comprobó que los extractos metanólicos al 2% sobre *Fusarium oxysporum* y *Fusarium oxysporum fsp. radicis-lycopersici* tuvo un efecto inhibitorio a las 72 horas del 49% para las hojas y 20% para los tallos concluyendo probablemente los compuestos inhibitorios se encuentran presentes en mínimas cantidades y sugiere que el hongo tiene mecanismos para degradar los componentes antagónicos de los extractos.



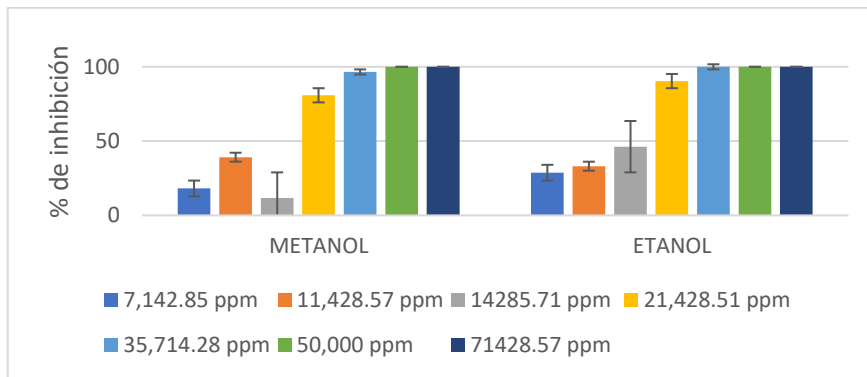


Fig. 15 Comparación del porcentaje de inhibición presentadas por el extracto botánico de *H. patens* sobre el patógeno *B. cinerea* usando Metanol y Etanol como solventes.

## 5.CONCLUSIONES

Se concluye que los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma longibrachiatum* y *Bacillus amyloliquefaciens* no mostraron eficiencia de inhibición sobre el moho gris de la fresa.

El uso de extractos etanólicos y metanólicos de *Hamelia patens* mostraron un efecto positivo sobre la inhibición del crecimiento del patógeno.

## 6.LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 1996. Plant pathology. Fourth Edition. Academic Press. New York. 635 p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. San Diego, California. 952 pp.
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Rana, V. S., Sati, O. P., & Walia, S. 2014. Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. Natural Product Research, 29(10), 914–920. doi:10.1080/14786419.2014.958739
- Ahmad, A., Pandurangan, A., Singh, N., & Ananad, P. 2012. A mini review on chemistry and biology of *Hamelia patens* (Rubiaceae). Pharmacognosy Journal, 4(29), 1-4.
- Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M.R., Nazemi, A., and Zamani, Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. Springer Plus 2:41.
- Baena, R., Araujo, E. S., Souza, J. P., Bischoff, A. M., Zarbin, P. H., Zawadneak, M. A., & Cuquel, F. L. 2022. Ripening stages and volatile compounds present in strawberry fruits are involved in the oviposition choice of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). Crop Protection, 153, 105883.
- Barnett, H.L y Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. The American Phytopathological Society. 218 pp.
- Brian, P. W., Curtis, P. J., Hemming, H. G., & McGowan, J. C. 1946. The production of viridin by pigment-forming strains of *Trichoderma viride*. Annals of Applied Biology, 33(2), 190-200.

- Brito, J. P., Ramada, M. H., de Magalhães, M. T., Silva, L. P., & Ulhoa, C. J. 2014. Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. SpringerPlus, 3(1), 1-10.
- Brzezinska, M. S., & Jankiewicz, U. 2012. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. Current Microbiology, 65, 666-672.
- Campbell, R. J., Grayson, R. L., & Marini, R. P. 1990. Surface and ultrastructural feeding injury to strawberry leaves by the twospotted spider mite. HortScience, 25(8), 948-951.
- Cardenas, E., & Corredor, D. 1989. Biología del trips *Frankliniella occidentalis* (Pegande)(Thysanoptera: Thripidae) sobre crisantemo *Chrysanthemum morifolium* L. bajo condiciones de laboratorio. Agronomía Colombiana, 1-2.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., & Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology, 65(3), 929-935.
- Cepeda, L. M. 2010. Determinación de metabolitos secundarios a partir de la cepa nativa cv15nd aislada del Páramo Cruz Verde. Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Javeriana.
- COFEPRIS. 202. Consulta de registros sanitarios de plaguicidas, nutrientes vegetales y LMR. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>.
- Coll, M., Shakya, S., Shouster, I., Nenner, Y. y Steinberg, S. 2007. Herramientas para la toma de decisiones en el manejo de *Frankliniella occidentalis* en fresa: consideración de mercados objetivo. Entomologia Experimentalis et Applicata, 122 (1), 59-67

- Cruz Díaz, J.D.I.1994. Purificación y caracterización de hidrolasas implicadas en el microparasitismo de *Trichoderma harzianum*. Tesis Doctoral Inédita. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Daniel, J.F. y Rodrigues, Filho, E. 2007. Peptaibols de *Trichoderma*. Informes de Productos Naturales, 24 (5), 1128-1141.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E., and Jacques, M.A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. European Journal of Plant Pathology 119:203-215.
- Daugaard, H. (2000). Effect of cultural methods on the occurrence of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.) in strawberries. Biological Agriculture & Horticulture, 18(1), 77–83. doi:10.1080/01448765.2000.9754866
- Dean, R., Van Kan, JA, Pretorius, ZA, Hammond-Kosack, KE, Di Pietro, A., Spanu, PD, et al. 2012. Los 10 principales patógenos fúngicos en patología vegetal molecular. Mol. Plant Pathol. 13 (4), 414–430. doi:10.1111/j.13643703.2011.00783.x
- Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en Opción al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- Dickinson, JM, Hanson, JR, Hitchcock, PB y Claydon, N. 1989. Estructura y biosíntesis de harzianopiridona, un metabolito antifúngico de *Trichoderma harzianum*. Revista de la Sociedad Química, Perkin Transactions 1, (11), 1885. doi:10.1039/p19890001885
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology, 9(10), 749–759. doi:10.1038/nrmicro2637

- Edger, P. P., Poorten, T. J., VanBuren, R., Hardigan, M. A., Colle, M., McKain, M. R., & Knapp, S. J. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature Genetics*, 51(3), 541-547.
- Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. y Henis, Y. 1983. Parasitismo de *Trichoderma* spp. en microscopía electrónica de barrido y microscopía de fluorescencia de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. *Fitopatología*, 73 (1), 85-88.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and diseases, they cause in agricultural systems – an introduction. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, pp. 1–8. Dordrecht: Springer, Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_1).
- Escudero, LA .2014. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) una nueva plaga de frutales que se está extendiendo mundialmente. Distribución, biología y ecología. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 34: 13–19
- Feliziani, EG, Romanazzi. 2016. Deterioro poscosecha de la fruta de fresa: etiología, epidemiología y manejo de enfermedades. *J. Berry Res.* 6, 47–63. doi: 10.3233 / JBR-150113.
- Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G., Garay-Serrano, E., & Cárdenas-Navarro, R. 2014. First report of *Xanthomonas fragariae* causing angular leaf spot on strawberry plants in México. *Plant Disease*, 98(5), 682–682. doi:10.1094/pdis-07-13-0691-pdn
- Fickers, P. 2012. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(1), 38–43. doi:10.3844/ajbbbsp.2012.38.43
- Fira, D, Dimkić, I, Berić, T, Lozo, J and Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, S0168165618305844–. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044

- Freeman, S., Horowitz, S., & Sharon, A. 2001. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology*, 91(10), 986-992.
- Freitas, JAD (2014). Controle biológico de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) em morangueiro no sul de Minas Gerais. Tesis de Doctorado. Universidad de São Paulo.
- Gent, D.H., Lang, J.M., and Schwartz, H.F. 2005. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant Disease* 89(6), 558-564.
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Romandini, S., Bompadre, S., Diamanti, J., & Battino, M. 2013. The potential impact of strawberry on human health. *Natural Product Research*, 27(4-5), 448-455.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. expresión de actividad quitinasa. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 58-63.
- González-Domínguez, S. G., Santillán-Galicia, M. T., González-Hernández, V., Suarez Espinosa, J., & González-Hernández, H. (2015). Variability in damage caused by the mite *Tetranychus urticae* (Trombidiformes: Tetranychidae) Koch on three varieties of strawberry. *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1371-1380.
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L., ... & Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 87-96.
- Gupta, V. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, M. 2014. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. First Edición Elsevier Science Technology. 650 p.

- Haidar, R., Fermaud, M., Calvo-Garrido, C., Roudet, J., & Deschamps, A. 2016. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathologia Mediterranea*, 301-322.
- Hardigan, M. A., Lorant, A., Pincot, D. D., Feldmann, M. J., Famula, R. A., Acharya, C. B., ... & Knapp, S. J. 2021. Unraveling the complex hybrid ancestry and domestication history of cultivated strawberry. *Molecular Biology and Evolution*, 38(6), 2285-2305.
- Hernández-Castillo, F. D., Lira-Saldivar, R. H., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M. E., Padrón-Corral, E., & Hernández-Suárez, M. 2008. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton Buenos Aires*, (77), 241-252.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A., Harman, GE y Kubicek, CP. 1998. *Trichoderma* y *Gliocladio* control biológico: una visión general en: *Trichoderma & Gliocladium: enzimas, control biológico y aplicaciones comerciales*. Harman GE, Kubice CP.(Eds), 2 , 131-151.
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- Jarvis, W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species - Taxonomy, physiology, and pathogenicity. A guide to the literature, Monograph no. 14, Ottawa, Research Branch, Canada Department of Agriculture.
- Jeon, J. C., Kim, H. K., Koo, H. N., Kim, B. S., Yang, J. O., & Kim, G. H. 2022. Synergistic effect of cold treatment combined with ethyl formate fumigation against *Drosophila suzukii* (Diptera: *Drosophilidae*). *Insects*, 13(8), 664.



- Kaushik, C., & Singh, M. V. 2020. An updated phytopharmacological review on *Hamelia patens* Jacq. Int. J. Pharmacogn, 7, 52-61
- Keswani, C., Singh, S. P., & Singh, H. B. 2013. A superstar in biocontrol enterprise: *Trichoderma* spp. Biotech Today, 3(2), 27-30.
- Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, FM, Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, LA, & Aguado Rodríguez, GJ. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 7 (5), 1189-1198.
- Lee, H. J., & Kim, H. Y. 2011. Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(3), 229-235.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., ... & Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Management Science, 58(9), 876-888.
- Lopes, L. P., Alves, P. F. R., Zandoná, C., Nunes, M. P., & Mehta, Y. R. 2008. A semi-selective medium to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds and its eradication through seed treatment with tolylfluanid. Summa Phytopathologica, 34, 287-288.
- Lorenzini, M., & Zapparoli, G. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. Plant pathology, 63(6), 1326-1335.
- Lu, Y., Ma, D., He, X., Wang, F., Wu, J., Liu, Y., ... & Deng, J. 2021. *Bacillus subtilis* KLBC BS6 induces resistance and defence-related response against *Botrytis cinerea* in blueberry fruit. Physiological and Molecular Plant Pathology, 114, 101599.
- Martínez-Núñez, M. A., & López, V. E. L. Y. (2016). Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. Sustainable Chemical Processes, 4, 1-8.

- Martínez-Núñez, M. A., & López, V. E. L. Y. 2016. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*, 4, 1-8.
- Martínez-Núñez, M. A., & López, Veli. 2016. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes* 13(4), 4, 1-8.
- Mesa-Vanegas, A. M., Marín, A., & Calle-Osorno, J. 2019. Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 32-44.
- Mogazy, A. M., Mohamed, H. I., & El-Mahdy, O. M. 2022. Calcium and iron nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in strawberry against *Botrytis cinerea*. *Process Biochemistry*, 115, 128-145.
- Muñoz, F. R. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Protection*, 21(1), 11-15.
- Nam, M.H., Kim, H.S., Park, M.S., Kim, T.I., Lee, E.M. and Kim, H.G. 2017. Damage and potential of fungus gnat as a *Fusarium* vector in the strawberry plants in Korea. *Acta Hortic.* 1156, 857-862 DOI: 10.17660/ActaHortic.2017.1156.126
- Ochoa, M. S., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., & Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- Ochoa, M. S., Madrigal, R. P., Martínez, M. T., & Carreón, A. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- Otieno, J. A., Stukenberg, N., Weller, J., & Poehling, H. M. 2018. Efficacy of led-enhanced blue sticky traps combined with the synthetic lure lurem-tr for trapping of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). *Journal of Pest Science*, 91, 1301-1314.

- Rodríguez Navarro, M. C., & Castro del Ángel, E. Actividad inhibitoria in vitro de extractos de *Hamelia patens* Jacq (Rubiaceae) sobre *Rhizoctonia solani* Kühn (Ceratobasidiaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., & Landi, L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 24-27.
- Rugiero Escalona, Catalina. 2018. Potencial biológico de *Hamelia patens* Jacq. y *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schlttdl. en el control de *Fusarium oxysporum* y el tratamiento de diabetes. Tesis de Licenciatura. Instituto Politecnico Nacional.
- Sá Argolo, P. 2012. Gestión integrada de la araña roja *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): optimización de su control biológico en clementinos. Doctoral Dissertation. Universitat Politècnica de València.
- Saettler, A. W. 1989. Assessment of yield loss caused by common blight of beans in Uganda. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative*, 35, 113-114.
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., & Stoll, A. 2018. Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity- an example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 166(9), 601–612. doi:10.1111/jph.12718
- Saravanakumar, K., Lu, Z., Xia, H., Wang, M., Sun, J., Wang, S., ... & Chen, J. 2018. Triggering the biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma harzianum* through inhibition of pathogenicity and virulence related proteins. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 5(2), 271-279.
- Scarselletti, R., & Faull, J. L. 1994. In vitro activity of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research*, 98(10), 1207-1209.

- Sharaf, E. F., El-Sarrany, A. E. Q., & El-Deeb, M. 2012. Biorecycling of shrimp shell by *Trichoderma viride* for production of antifungal chitinase. African Journal of Microbiology Research, 6(21), 4538-4545.
- Shawer, R. 2020. Chemical Control of *Drosophila suzukii*. In: Garcia, F.R.M. (eds) *Drosophila suzukii* Management. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-62692-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-62692-1_7)
- SIAP servicio de información agrícola y pesquera. (2021). Anuario Estadístico de la producción agrícola. Consultado el: 21-03-23. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Simpson, D. 2018. The economic importance of strawberry crops. in: Hytönen, the genomes of Rosaceous berries and their wild relatives. Compendium of Plant Genomes. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76020-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76020-9_1)
- Tait, G., Mermer, S., Stockton, D., Lee, J., Avosani, S., Abrieux, A., ... & Walton, V. M. 2021. *Drosophila suzukii* (Diptera: *Drosophilidae*): a decade of research towards a sustainable integrated pest management program. Journal of Economic Entomology, 114(5), 1950-1974.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 42(3), 131-138.
- Thomashow, LS, Weller, DM, Bonsall, RF y Pierson III, LS 1990. Producción del antibiótico fenazina-1-ácido carboxílico por especies de *Pseudomonas fluorescens* en la rizósfera del trigo. Microbiología Aplicada y Ambiental, 56 (4), 908-912.
- Vagelas I., Kalorizou H., Papachatzis A., Botu M. 2009. Biotechnol. & Biotechnol. Eq.,
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., & Tirry, L. 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus*

- urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8), 563–572. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.05.008
- Viecelli, C. A., & Moerschbacher, T. 2013. Control of the common bacterial blight in the bean crop by using foliar fertilizers. *Scientia Agraria Paranaensis*, 12(1), 66-72.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., ... & Lorito, M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Willetts, H.J. 1969. Structure of the outer surfaces of sclerotia of certain fungi. *Archiv. Mikrobiol.* 69, 48–53. <https://doi.org/10.1007/BF00408562>
- Worasatit, N., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., & Rowland, C. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research*, 98(12), 1357-1363.
- Yan, L., Jing, T., Yujun, Y., Bin, LI, Hui, LI y Chun, LI. 2011. Eficiencia de biocontrol de *Bacillus subtilis* SL-13 y caracterización de una quitinasa antifúngica. *Revista China de Ingeniería Química*, 19 (1), 128-134.
- Yermiyahu, U., Halpern, M., & Shtienberg, D. 2020. NH<sub>4</sub> fertilization increases susceptibility of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) to grey mould (*Botrytis cinerea*) due to decrease in Ca uptake. *Phytoparasitica*, 48, 685-697.
- Zaragoza, R. 2013. Evaluación de técnicas hidropónicas de producción el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*) bajo invernadero. Tesis de Maestría en Agroplásticultura. Centro de Investigación en Química Aplicada. Saltillo. México. 85 p.